

MAYSA MARIANA CRUZ

EFEITOS DO ÁCIDO PALMITOLEICO SOBRE A EXPRESSÃO
GÊNICA, METABOLISMO E FUNÇÃO DO TECIDO ADIPOSEO
DE CAMUNDONGOS OBESOS

Tese apresentada, como exigência parcial
para obtenção de título de Doutor em
Ciências (Biologia Química), ao Programa
de Pós-Graduação Strictu Sensu do Instituto
de Ciências Ambientais, Químicas e
Farmacêuticas da Universidade Federal de
São Paulo – Campus Diadema.

DIADEMA

2019

Cruz, Maysa M

Efeitos do ácido palmitoleico sobre a expressão gênica, metabolismo e função do tecido adiposo de camundongos obesos / Maysa M Cruz – Diadema, 2019.

Tese para obtenção do título de Doutor em ciências pelo programa de pós-graduação
Stricto Sensu. Universidade Federal de São Paulo, 2019.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Isabel Cardoso Alonso-Vale

1. Beta-oxidação; 2. Lipogênese; 3. Adipogênese; 4. *Browning*; 5. Inflamação.

CDD 616.398

Candidata: Maysa Mariana Cruz

Título do trabalho: Efeitos do ácido palmitoleico sobre a expressão gênica, metabolismo e função do tecido adiposo de camundongos obesos

Natureza: Tese apresentada, como exigência parcial para obtenção de título de Doutor em Ciências (Biologia Química), ao Programa de Pós-Graduação Strictu Sensu do Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema.

Objetivo: O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos metabólicos e gênicos do ácido palmitoleico no tecido adiposo branco e marrom de camundongos C57BL/6 submetidos (ou não) à dieta rica em lipídios.

Área de concentração: Biologia Química

A comissão julgadora do trabalho de defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada/...../....., considerou o (a) candidato (a):

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Profª Dra. Maria Isabel Cardoso Alonso-Vale (orientadora)
Universidade Federal de São Paulo

Profª Dr. Marcelo Augusto Christoffoleti
Universidade Federal do ABC

Prof Dra. Laureane Nunes Masi
Universidade Cruzeiro do Sul

Profª Dra. Mônica Marques Telles
Universidade Federal de São Paulo

Profª Dra. Miriam Helena Fonseca Alaniz
Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo

Profª Dra. Suzete Maria Cerutti (Suplente)
Universidade Federal de São Paulo

Profª Dra. Vera Lucia Flor Silveira (Suplente)
Universidade Federal de São Paulo

Dedico este trabalho aos meus pais, Kátia e Everaldo; e irmãos, Amanda e Caio. Por todo o amor, apoio, incentivo e cobrança, por vezes necessárias. Toda a estrutura familiar que tive nessa vida permitiu a energia empregada na obtenção deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre estar comigo em todos os momentos, por me dar força e competência necessárias para realização deste trabalho.

À minha amada e insubstituível mãe, Jossana Kátia, por toda ternura, incentivo, apoio, suporte, carinho, compreensão e amizade. Por me ensinar a agradecer à Deus até pelas provações que passo e por todas as vezes que me perguntou se eu estava me cuidando, estudando, tomando água e comendo frutinhas.

Ao meu querido pai, Everaldo, por todo o amor e apoio que me deu durante toda a minha vida acadêmica e profissional, por me encorajar a ir atrás dos meus objetivos e não ter medo das dificuldades, por sempre me chamar para ajudar a segurar a escada quando eu era criança, assim ele não cairia ao trocar a lâmpada, sempre me fazendo sentir forte o bastante.

À minha indescritível irmã, Amanda, por me encorajar e sempre demonstrar o tamanho orgulho que sente por mim e pelo meu trabalho, por sempre me ouvir em momentos de aflição e sempre focar no melhor da situação, por comprar briga minha quando alguém mexe comigo e ser a parceira da minha vida.

Ao meu irmão caçula, Caio, que sempre tentou mandar em mim, agradeço por me cobrar e incentivar a crescer profissionalmente, por me dizer que se eu não estava encontrando, era porque não estava procurando direito, por todas as demonstrações não muito explícitas, porém claras do seu tamanho amor por mim.

À minha grande amiga e orientadora, Maria Isabel, por todos os ensinamentos, explicações, ajuda, apoio, broncas e por me incentivar sempre a crescer nessa trajetória acadêmica, por também ser quem é, praticamente uma mãe, durante todo o tempo que realizei este trabalho. Agradeço por todos os momentos bons e ruins durante este projeto, a confecção da tese de doutorado, as reuniões para melhorias e planejamento de experimentos, por fim, por ser essa pessoa maravilhosa e admirável. Além disso, agradeço por todas as explicações sobre bioquímica, com todas aquelas expressões com as mãos, que facilitaram tanto meu entendimento, jamais poderei agradecer adequadamente. Lembro do dia em que me disse que me veria na banca de doutorado, bom, este dia chegou!

Ao meu Panqueca, por sempre estar comigo durante todos os meus estudos, desde o mestrado. Te perdoo por pisar no meu computador e apagar algumas informações, e agradeço pela companhia de sempre, mesmo que até tarde da madrugada. E ao meu anjinho, agradeço a Deus por sua vida. Agradeço por aguentar todo o estresse comigo. Seja forte e aguente firme!

Ao meu namorado Hervert, por todo amor, apoio, paciência e dedicação, e por me incentivar a terminar meu doutorado, por também me achar capaz, além de acreditar e confiar em mim.

À minha parceira de laboratório, Roberta, por todas as colaborações, conversas, risadas e experimentos que passamos juntas, foi realmente uma relação duradoura e cheia de conquistas, agradeço pela parceria de sempre.

À Talita, por toda ajuda, conversas, experimentos que realizamos juntas, e por todas as discussões de resultados e sobre a vida.

Aos meus primos, pelo apoio e incentivo, principalmente quando fiz minha primeira viagem internacional para um congresso.

Aos meus tios, especialmente tia Kênia, por vibrar comigo quando tive minha primeira viagem internacional para um congresso, e tio Rangel, por me parabenizar por estudar e sempre incentivar a seguir em frente com a vida acadêmica, salientando sempre que eu seria a primeira Doutora da família.

Aos meus colegas de laboratório Viviane, Fernanda Batini, Fernanda Abdala, Vitor e Jussara, por toda colaboração nos experimentos.

Aos meus alunos, que me inspiram e me fazem querer aprender cada vez mais, porque eu amo passar o pouco que aprendi, além de estar disposta a continuar aprendendo para continuar ensinando. Almejo ainda passar a eles a paixão pela bioquímica e ensiná-los o que foi passado para mim pela minha orientadora: a não ter medo da bioquímica, e que a bioquímica é linda, pois ela explica tudo. Espero em Deus ter muita saúde para estudar e transmitir conhecimento até o fim dos meus dias. Sou muito grata por tudo e minha vida pessoal, acadêmica e profissional.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Tudo com boa vontade dá certo.”

Everaldo Missias da Cruz

RESUMO

O tecido adiposo branco (TAB) é um tecido especializado em armazenamento de energia na forma de triacilglicerol (TAG) e produção de hormônios e citocinas, participando de forma autócrina, parácrina e endócrina no controle do metabolismo energético. Por outro lado, o tecido adiposo marrom (TAM) é especializado em dissipar energia na forma de calor, ou termogênese. A obesidade é um distúrbio metabólico multifatorial, onde a expansão do TAB favorece a instalação de um processo inflamatório crônico de baixo grau, contribuindo para o surgimento e exacerbação de quadros de dislipidemias, hipertensão, resistência à insulina, diabetes mellitus do tipo 2, dentre outras doenças. Neste sentido, diversos estudos desenvolvidos nas últimas décadas visam identificar novas estratégias para tratar a obesidade e doenças a ela relacionadas. O ácido palmitoleico é um ácido graxo (AG) de 16 carbonos, monoinsaturado no carbono ômega-7 (16:1n7). Foi descrito que este AG melhora a sensibilidade à insulina no músculo e TAB, diminui a esteatose hepática e possui efeitos na redução de parâmetros inflamatórios. Mostramos anteriormente que este AG aumenta o consumo de oxigênio, o conteúdo proteico de complexos mitocondriais bem como a produção de ATP, além de aumentar a lipólise e lipogênese em adipócitos 3T3-L1. Não há estudos sobre os efeitos deste AG no tecido adiposo de um organismo induzido à obesidade por dieta hiperlipídica (HL). Assim, o objetivo deste trabalho foi o de investigar a ação deste AG sobre parâmetros metabólicos, inflamatórios, adipogênicos e de “*browning*” no tecido adiposo em modelo experimental de obesidade induzida por dieta HL e linhagem celular de pré-adipócitos (3T3-L1), empregando testes metabólicos e estudos de expressão gênica como estratégias experimentais. Os resultados mostraram que a dieta HL aumentou substancialmente a massa corpórea dos animais, porém o ácido palmitoleico apresentou uma forte tendência em prevenir o ganho de massa corpórea dos mesmos. O tratamento dos animais obesos com o 16:1n7 aumentou a oxidação de palmitato bem como a atividade lipogênica de adipócitos, mas não afetou a lipólise e a captação de glicose. A dieta HL promoveu aumento dos triglicerídeos do fígado, efeito prevenido pelo ácido palmitoleico. Além disso, o tratamento com ácido palmitoleico preveniu parcialmente o aumento da expressão de genes que codificam ATGL, HSL, perilipina, lipina, C/EBP- α , PPAR- γ , C/EBP- β , CPT1, NRF1, TFAM, PRDM16 e NOS2 no TAB subcutâneo dos animais desencadeado pela obesidade induzida por dieta HL e aumentou o conteúdo do RNAm que codifica FABP4. A expressão gênica de *Pgcl1* não apresentou diferença entre os grupos e a obesidade praticamente aboliu a expressão gênica de *Ucp1*. Além disso, a obesidade desencadeou aumento da expressão gênica de *Mcp1* e *Tnfa* em ambos os tecidos analisados (subcutâneo e visceral), sendo que a suplementação com o ácido palmitoleico promoveu aumento mais acentuado da expressão destes genes. No tecido adiposo visceral destes animais, a dieta HL promoveu aumento da expressão dos genes que codificam HSL e perilipina, sendo que ácido palmitoleico reverteu este efeito; a dieta HL também desencadeou aumento de expressão de genes que codificam leptina, adiponectina, CPT1, MCP1, TNF- α e SOD2 bem como diminuiu a FAS, ACC1 e PGC1- α . O tratamento com ácido palmitoleico não preveniu este aumento no TAB visceral. Quanto ao TAM, não foi verificada alterações significativas, exceto por uma diminuição na expressão da *Fas* em decorrência da dieta HL, com queda mais acentuada no grupo tratado com o AG. Em relação aos marcadores de *browning* do TAB, verificamos um aumento relevante na expressão do gene que codifica a proteína desacopladora UCP1 (acompanhada de uma elevação de *Tfam*) em adipócitos 3T3-L1 tratados com ácido palmitoleico. Em suma, os dados mostram que o ácido palmitoleico promove mudanças metabólicas e previne parcialmente o aumento da expressão de genes desencadeado pela obesidade, sugerindo que os animais tratados com o AG não necessitam da mesma magnitude de adaptação metabólica para lidar com a demanda energética proveniente da dieta HL. Além

disso, os dados indicam que o tecido adiposo dos animais Obeso+n7 possa estar mais metabolicamente ativo em relação ao grupo Obeso. Embora não comprovado no presente estudo, postulamos com nossos resultados que à longo prazo (tanto no desencadeamento da obesidade, quanto no tempo de tratamento), os efeitos do ácido palmitoleico sejam relevantes e benéficos para a função/disfunção do tecido adiposo de um organismo obeso, com consequente repercussão na homeostase metabólica sistêmica do mesmo.

Palavras-chave: beta oxidação, lipogênese, adipogênese, *browning*, inflamação.

ABSTRACT

White adipose tissue (WAT) is a tissue specialized in energy storage in the form of triacylglycerol (TAG) and production of hormones and cytokines, participating in autocrine, paracrine and endocrine in the control of energy metabolism. On the other hand, brown adipose tissue (BAT) is specialized in to dissipate energy in the form of heat, or thermogenesis. Obesity is a multifactorial metabolic disorder, where the expansion of WAT favors the installation of a low-grade chronic inflammatory process, contributing to the emergence and exacerbation of dyslipidemias, hypertension, insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, among others diseases. In this sense, several studies developed in recent decades aim to identify new strategies to treat obesity and related diseases. Palmitoleic acid is a fatty acid (FA) with 16 carbons, monounsaturated at the omega-7 carbon (16:1n7). It has been described that this FA improves insulin sensitivity in muscle and WAT, decreases hepatic steatosis and it has effects in reducing inflammatory parameters. We have previously shown that this FA increases oxygen consumption, protein content of mitochondrial complexes as well as ATP production, besides increasing lipolysis and lipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. There are no studies on the effects of this FA on the adipose tissue of an organism induced to obesity by hyperlipid (HL) diet. Thus, the objective of this work was to investigate the action of this FA on metabolic, inflammatory, adipogenic and browning parameters in adipose tissue in an experimental model of obesity induced by HL diet and pre-adipocyte cell line (3T3-L1), using metabolic tests and gene expression studies as experimental strategies. The results showed that the HL diet substantially increased the body mass of the animals, but the palmitoleic acid showed a strong tendency to prevent their gain in body mass. Treatment of obese animals with 16:1n7 increased palmitate oxidation as well as adipocyte lipogenic activity, but did not affect lipolysis and glucose uptake. The HL diet promoted increased triglycerides of the liver, an effect prevented by palmitoleic acid. In addition, treatment with palmitoleic acid partially prevented the expression of genes encoding ATGL, HSL, perilipin, lipin, C/EBP- α , PPAR- γ , C/EBP- β , CPT1, NRF1, TFAM, PRDM16 and NOS2 in the subcutaneous WAT of the animals triggered by obesity induced by HL diet and increased the content of the mRNA encoding FABP4. Gene expression of *Pgcl1a* showed no difference between groups and obesity practically abolished the *Ucp1* gene expression. In addition, obesity triggered increased gene expression of *Mcp1* and *Tnfa* in both tissues analyzed (subcutaneous and visceral), and supplementation with palmitoleic acid promoted a more marked increase in the expression of these genes. In the visceral adipose tissue of these animals, the HL diet promoted increased expression of genes encoding HSL and perilipin, and palmitoleic acid reversed this effect; the HL diet also triggered increased expression of genes encoding leptin, adiponectin, CPT1, MCP1, TNF- α and SOD2 as well as decreased FAS, ACC1 and PGC1- α . Treatment with palmitoleic acid did not prevent this increase in visceral WAT. Regarding BAT, no significant changes were observed except for a decrease in *Fas* expression due to the HL diet, with a more pronounced decrease in the group treated with FA. Regarding the WAT browning markers, we found a significant increase in the expression of the gene encoding the UCP1 decoupling protein (accompanied by a *Tfam* elevation) in 3T3-L1 adipocytes treated with palmitoleic acid. In summary, the data show that palmitoleic acid promotes metabolic changes and partially prevents the increase in gene expression triggered by obesity, suggesting that treated animals with the FA do not require the same magnitude of metabolic adaptation to cope with energy demand from HL diet. In addition, the data indicate that the fat tissue of Obese+n7 animals may be more metabolically active than the Obese group. Although not proven in the present study, we postulate with our results that in the long term (both on the onset of obesity and on treatment time) the effects of palmitoleic acid are

relevant and beneficial for the function / dysfunction of the adipose tissue of an obese organism, with consequent repercussion in the systemic metabolic homeostasis of the same.

Key-words: beta-oxidation, lipogenesis, adipogenesis, browning, inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** A) Perfil da massa corpórea. B) Perfil do consumo alimentar. Os dados foram coletados semanalmente, a partir do início das gavagens até a eutanásia 46
- Figura 2.** A) Massa corpórea inicial. B) Diferença entre massa corpórea inicial e final (delta) dos animais que receberam 4 semanas de gavagens diárias com 16:1n7 47
- Figura 3.** Massa dos tecidos dos animais. A) Subcutâneo; B) Epididimal; C) Retroperitoneal; D) Tecido adiposo marrom (TAM); E) Coração F) Fígado 48
- Figura 4.** Análise gênica no TAB subcutâneo. A) *Tfam*. B) *Cpt1*. C) *Nrf1*. D) *Ucp1*. E) *Pgc1 alfa*. F) *Ppar gama*. Os resultados foram corrigidos pela expressão do gene constitutivo (*Gapdh*) e normalizados em relação ao controle (H₂O) 48
- Figura 5.** A) Perfil da massa corpórea dos animais. B) Perfil de consumo alimentar dos animais 51
- Figura 6.** A) Análise de ganho de massa corpórea no período I. B) Análise de ganho de massa corpórea no período II. C) Análise de ganho de massa corpórea no período II entre os grupos que receberam a dieta HL 52
- Figura 7.** A) Análise de eficiência energética período I. B) Análise de eficiência energética período II. C) Análise de eficiência alimentar no período I. D) Análise de eficiência alimentar período II 53
- Figura 8.** Massa (em gramas) dos tecidos dos animais. A) Tecido adiposo marrom. B) Tecido adiposo branco subcutâneo. C) Tecido adiposo branco epididimal. D) Tecido adiposo branco retroperitoneal. E) Coração 54
- Figura 9.** A) Massa (em gramas) do fígado dos animais, os dados representam média \pm EPM. B) Análise dos triglicérides do fígado 54
- Figura 10.** Hipertrofia dos adipócitos. A) Diâmetro celular médio dos adipócitos RP e B) Diâmetro celular médio dos adipócitos SUB 55
- Figura 11.** Dosagens plasmáticas de A) Glicose, B) Triglicerídeos, C) Colesterol Total, D) HDL, E) LDL e F) VLDL 56
- Figura 12.** Atividade lipolítica do tecido adiposo branco. A) Lipólise basal (TAB retroperitoneal), B) Lipólise estimulada por isoproterenol (TAB retroperitoneal), C) Lipólise basal (TAB subcutâneo), D) Lipólise estimulada por isoproterenol (TAB subcutâneo) 57
- Figura 13.** Captação de glicose basal (A) e estimulada por insulina (B) em adipócitos do TAB subcutâneo 58
- Figura 14.** Oxidação de ácidos graxos (A) e lipogênese (B) em adipócitos isolados do tecido adiposo branco subcutâneo 58

| | |
|---|----|
| Figura 15. Conteúdo de RNAm de genes relacionados à lipólise em TAB subcutâneo. A) <i>Atgl</i> , B) <i>Hsl</i> e C) <i>Perilipina</i> | 59 |
| Figura 16. Análise gênica no TAB subcutâneo. A) <i>Lpl</i> , B) <i>Fabp4</i> , C) <i>Lipina</i> , D) <i>Fas</i> , E) <i>Acc1</i> , F) <i>Glut-4</i> , G) <i>Leptina</i> e H) <i>Adiponectina</i> | 61 |
| Figura 17. Conteúdo de RNAm de genes relacionados à adipogênese no TAB subcutâneo. A) <i>C/ebp-alfa</i> , B) <i>Ppar-gama</i> , C) <i>Pref-1</i> e D) <i>C/ebp-beta</i> | 62 |
| Figura 18. Análise gênica no TAB subcutâneo. A) <i>Cpt1</i> , B) <i>Nrf1</i> , C) <i>Tfam</i> , D) <i>Pgc1-alfa</i> , E) <i>Ucp1</i> e F) <i>Prdm16</i> | 64 |
| Figura 19. Conteúdo de RNAm de genes relacionados à inflamação no TAB subcutâneo. A) <i>Mcp1</i> , B) <i>Tnf-alfa</i> e C) <i>Nos2</i> | 65 |
| Figura 20. Conteúdo de RNAm de genes relacionados à inflamação no TAB subcutâneo. A) GPX, B) Catalase, C) SOD 1 e D) SOD 2 | 66 |
| Figura 21. Conteúdo de RNAm de genes relacionados à lipólise no TAB epididimal. A) <i>Atgl</i> , B) <i>Hsl</i> e C) <i>Perilipina</i> | 67 |
| Figura 22. Conteúdo de RNAm de genes relacionados à lipogênese, captação de glicose e metabolismo no TAB epididimal. A) <i>Lpl</i> , B) <i>Fabp4</i> , C) <i>Lipina</i> , D) <i>Fas</i> , E) <i>Acc1</i> , F) <i>Glut-4</i> , G) <i>Leptina</i> e H) <i>Adiponectina</i> | 68 |
| Figura 23. Conteúdo de RNAm de genes relacionados à adipogênese no TAB epididimal. A) <i>Cebp-alfa</i> , B) <i>Ppar-gama</i> , C) <i>Pref-1</i> e D) <i>Cebp-beta</i> | 69 |
| Figura 24. Conteúdo de RNAm de genes relacionados à beta-oxidação, função e biogênese mitocondrial e browning no TAB epididimal. A) <i>Cpt1</i> , B) <i>Nrf1</i> , C) <i>Tfam</i> , D) <i>Pgc1-alfa</i> , E) <i>Ucp1</i> e F) <i>Prdm16</i> | 70 |
| Figura 25. Conteúdo de RNAm de genes relacionados à inflamação no TAB epididimal. A) <i>Mcp1</i> , B) <i>Tnf-alfa</i> e C) <i>Nos2</i> | 71 |
| Figura 26. Conteúdo de RNAm de genes relacionados atividade antioxidante no TAB epididimal. A) <i>Glutathione peroxidase (Gpx)</i> , B) <i>Catalase (Cat)</i> , C) <i>Superóxido dismutase 1 (Sod1)</i> e D) <i>Superóxido dismutase 2 (Sod2)</i> | 72 |
| Figura 27. Análise gênica no tecido adiposo marrom. A) C/EBP-alfa (<i>Cebpa</i>), B) PPAR-gama (<i>Pparg</i>), C) Perilipina (<i>Plin</i>), D) Fas (<i>Fasn</i>), E) GLUT-4 (<i>Slc2a4</i>), F) CPT1 (<i>Cpt1</i>), G) TFAM (<i>Tfam</i>), H) PGC1-alfa (<i>Ppargc1a</i>), I) UCP1 (<i>Ucp1</i>) e J) PRDM16 (<i>Prdm16</i>) | 73 |
| Figura 28. Análise de adiponectina no tecido adiposo branco subcutâneo (A) e epididimal (B) por ELISA | 74 |
| Figura 29. Análise gênica em células 3T3-L1 de A) <i>Ucp1</i> , B) <i>Pgc1-alfa</i> , C) <i>Cpt1</i> e D) <i>Tfam</i> | 75 |

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das dietas utilizadas no protocolo experimental 2 39

Tabela 2. Sequências *sense* e *antisense* dos primers utilizados na RT-PCR em tempo real43

LISTA DE ABREVIATURAS

Acc1: *acetil-CoA carboxilase*

Adipoq: *adiponectina (gene)*

ACBP: proteína carreadora de Acil-CoA

Acetil-CoA: acetil-Coenzima A

aP2: FABP4

ATGL: *lipase de triacilglicerol do adipócito*

ATP : adenosina trifosfato

cAMP: Adenosina Mono-fosfato cíclico

cDNA: DNA complementar

C/EBPs: proteínas ligantes ao amplificador CCAAT

CO: controle

CO₂: dióxido de carbono

CPT: carnitina palmitoil tranferase

DAG: diacilglicerol

DMEM: dulbeccos modified eagle medium

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

EBF2: *early B-cell factor 2*

ELISA: imunoensaio enzimático

EPI: epididimal

FABP4: proteína carreadora de AGs

FADH₂: flavina adenina dinucleotídeo

FAS: *ácido graxo sintase*

FBS: soro bovino fetal

Glut-4: Transportador de glucose 4

Glut-1: Transportador de glucose 1

GPX: *glutathione peroxidase*

HDL: lipoproteína de alta densidade

HEPES: hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid

HL: hiperlipídica

HSL: *lipase hormônio sensível*

IL-6: interleucina 6

LDL: lipoproteína de baixa densidade

LPL: *lipase de lipoproteínas*

LPS: lipopolissacarídeo

MAG: monoacilglicerol

MCP1: proteína quimiotática de monócitos 1

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo

Nos2: *óxido nítrico sintase indutível*

NRF1: fator respiratório nuclear 1

PBS: tampão salino fosfato

PGC-1 α : coativador gamma 1 α do receptor ativado por proliferador de peroxisoma

PKA: proteína quinase A

PPAR- γ : receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomas

PRDM16: PRD1-BF-1-RIZ1 16

RIP140: receptor 140

RNA: ácido ribonucleico

RP: retroperitoneal

RT-PCR: reação em cadeia da *polimerase* em tempo real

SDS: dodecilsulfato de sódio

SOD: *superóxido dismutase*

SRC2/TIF2/GRIP1: steroid receptor coactivator-2 / transcriptional mediators / intermediary factor 2 / glucocorticoid receptor-interacting protein

SUB: subcutâneo

TAB: tecido adiposo branco

TAG: triacilglicerol

TAM: tecido adiposo marrom

TG: triglicérides

TFAM: fator mitocondrial A

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

T3: triiodotironina

TZD: thiazolidinedione

UCP1: proteína desacopladora 1

VLDLs: lipoproteína de muito baixa densidade

NFkB: fator nuclear kappa B

LISTA DE SÍMBOLOS

α : alfa

β : beta

Δ : delta

γ : gama

ω : ômega

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 22 |
| Revisão bibliográfica | 22 |
| 1.1 O tecido adiposo | 22 |
| 1.1.1 Tecido adiposo branco | 22 |
| 1.1.2 Tecido adiposo marrom | 23 |
| 1.1.3 Surgimento de adipócitos marrons ou beges (browning) do tecido adiposo branco | 24 |
| 1.2 Atividades metabólicas do tecido adiposo | 26 |
| 1.2.1 Lipólise | 26 |
| 1.2.2 Lipogênese | 27 |
| 1.2.3 Oxidação de ácidos graxos | 29 |
| 1.3 Ácidos graxos e sua participação no metabolismo energético | 30 |
| 1.3.1 O ácido palmitoleico | 30 |
| 1.4 Obesidade, doenças relacionadas e perspectivas de tratamento com o ácido palmitoleico | 32 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 35 |
| 3. OBJETIVO | 36 |
| 3.1 Estratégias Experimentais | 36 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 37 |
| 4.1 Modelos experimentais | 37 |
| 4.1.1 Protocolo experimental 1 | 37 |
| 4.1.2 Protocolo experimental 2 | 38 |
| 4.1.3 Protocolo experimental 3 | 39 |
| 4.1.3.1 <u>Diferenciação das células 3T3-L1</u> | 39 |
| 4.1.3.2 <u>Indução de browning</u> | 40 |
| 4.1.3.3 <u>Tratamento das células com os ácidos graxos</u> | 40 |
| 4.2 Dosagem de triglicérides no fígado | 40 |
| 4.3 Isolamento dos Adipócitos | 41 |
| 4.4 Dosagens plasmáticas | 41 |
| 4.5 Lipólise | 41 |
| 4.6 Captação de [³H]-2-Deoxi D-glicose | 42 |
| 4.7 Ensaio de Incorporação de [1 – C¹⁴] Palmitato em TAG e Oxidação a CO₂ | 42 |

| | |
|--|-----|
| 4.8 Extração do RNA total, transcrição reversa para síntese de cDNA e reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) | 43 |
| 4.9 Dosagem de adiponectina por ELISA | 44 |
| 4.10 Análises estatísticas | 45 |
| 5. RESULTADOS | 46 |
| 5.1 Protocolo experimental 1 | 46 |
| 5.1.1 <i>Massa corpórea e consumo alimentar dos animais</i> | 46 |
| 5.1.2 <i>Efeitos da suplementação com o ácido palmitoleico sobre a massa dos tecidos e a adiposidade</i> | 47 |
| 5.1.3 <i>Análise de expressão gênica</i> | 48 |
| 5.2 Protocolo experimental 2 | 50 |
| 5.2.1 <i>Massa corpórea e consumo alimentar dos animais</i> | 50 |
| 5.2.2 <i>Efeitos da dieta hiperlipídica e suplementação com o ácido palmitoleico sobre a massa dos tecidos, a adiposidade, a concentração de TG no fígado e a hipertrofia das células adiposas</i> | 53 |
| 5.2.3 <i>Dosagens plasmáticas</i> | 55 |
| 5.2.4 <i>Lipólise</i> | 56 |
| 5.2.5 <i>Captação de [³H]-2-deoxi D-glicose</i> | 57 |
| 5.2.6 <i>Oxidação de [1-C¹⁴] palmitato e incorporação em triacilgliceróis (lipogênese)</i> | 58 |
| 5.2.7 <i>Análises de Expressão Gênica</i> | 58 |
| 5.2.8 <i>Análises de Adiponectina por ELISA</i> | 74 |
| 5.3 Protocolo experimental 3 | 75 |
| 5.3.1 <i>Análise de expressão gênica após indução de browning em adipócitos 3T3-L1</i> | 75 |
| 6. DISCUSSÃO | 76 |
| 7. CONCLUSÃO | 88 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 90 |
| 9. APÊNDICES | 102 |
| Apêndice A – Documento da aprovação do trabalho no comitê de ética em pesquisa (CEP) | 102 |
| Apêndice B – CRUZ, et al. Lipids in Health and Disease, v. 17, p. 55, 2018 | 104 |
| Apêndice C – Colaborações e trabalhos publicados durante o período do doutorado | 117 |

1. INTRODUÇÃO

Revisão bibliográfica

1.1 O tecido adiposo

O tecido adiposo, ou órgão adiposo, é um tecido conjuntivo especializado em armazenar energia na forma de triacilglicerol (TAG). Os lipídios provenientes da dieta são absorvidos no intestino e podem ser estocados no tecido adiposo mesentérico, retroperitoneal, omental, perigonadal e subcutâneo, dentre outros coxins adiposos (TORTORA; DERRICKSON, 2014). Existem dois tipos de tecido adiposo: o branco e o marrom, sendo que o tecido adiposo branco (TAB) tem como principal função o estoque e armazenamento de excesso de energia em forma de TAG, enquanto que o tecido adiposo marrom (TAM) tem como principal função realizar termogênese, ou seja, produção de calor por desacoplamento mitocondrial (GESTA; TSENG; KAHN, 2007).

O tecido adiposo é considerado atualmente um órgão endócrino, que participa de forma crucial na regulação da homeostase energética. Sua efetividade no controle metabólico sistêmico, glicemia, catabolismo de carboidratos e lipídios depende do funcionamento adequado das células presentes neste tecido. Os adipócitos são as células do tecido adiposo. Também são encontradas neste tecido macrófagos, células mesenquimais, vasos sanguíneos dentre outras células que participam do funcionamento do mesmo e na comunicação com todos os outros órgãos e sistemas do organismo (KERSHAW; FLIER, 2004; PROENÇA et al., 2014; ROMACHO et al., 2014).

O tecido adiposo produz e secreta uma ampla gama de mediadores que o regulam de forma autócrina e parácrina, além de interagir com outros tecidos e órgãos distantes, como o fígado, o músculo esquelético, o pâncreas e o sistema cardiovascular (ROMACHO et al, 2014).

1.1.1 Tecido adiposo branco

O TAB é o maior reservatório energético do organismo em virtude de sua função de armazenar o excesso de calorias obtidas da dieta na forma de TAG. Possui também uma função endócrina de suma importância para a manutenção da homeostase metabólica sistêmica sendo considerado um órgão endócrino pela sua capacidade de liberar múltiplas substâncias bioativas, conhecidas como fatores derivados do adiposo ou adipocinas. As adipocinas do TAB incluem a leptina, responsável pela promoção de saciedade bem como o

controle do balanço energético; a adiponectina, que promove maior sensibilidade à insulina e o catabolismo de AGs; o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP1), envolvidos em processos inflamatórios, dentre várias outras citocinas (MORRISON; FARMER, 2000; VÁSQUEZ-VELA; TORRES; TOVAR, 2008).

A elevação do TAB, que ocorre na obesidade, é determinada pelo aumento do tamanho do adipócito (hipertrofia) e/ou do seu número (hiperplasia). Modificações no tamanho (diâmetro e volume) de adipócitos maduros ocorrem em resposta à ativação de suas ações metabólicas típicas, que são a lipogênese e a lipólise, e estas funções variam com a necessidade de incorporação ou liberação de lipídeos, que dependem, entre outros fatores, do estado nutricional do indivíduo, do seu gasto energético, da influência de hormônios (catabólicos ou anabólicos), da atividade de enzimas envolvidas nestes processos e da heterogeneidade característica existente entre os diversos grupamentos adiposos do organismo (JENSEN, 1997).

O número de adipócitos não é alterado no início precoce da obesidade, quando os depósitos adiposos se expandem por hipertrofia dos adipócitos (SPALDING et al., 2008), mas novos adipócitos se formam várias semanas após o início da alimentação de uma dieta hiperlipídica, levando à hiperplasia (WANG et al., 2013; JOE et al., 2009) provavelmente quando os adipócitos começam a atingir seu tamanho máximo. Uma correlação semelhante de hiper celularidade com a gravidade da obesidade tem sido observada em seres humanos (HIRSCH; BATCHELOR, 1976).

Modificações no número de adipócitos (hiperplasia), dependem da diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos, um processo denominado de adipogênese. Está estabelecido que fatores de transcrição (adipogênicos), incluindo o *receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomas* (PPAR- γ), e *as proteínas ligantes ao amplificador CCAAT* (CCAAT/*enhancer binding protein* - C/EBPs) são cruciais para a indução do fenótipo dos adipócitos. PPAR- γ e C/EBP- α juntos promovem a diferenciação por ativação da expressão de genes específicos de adipócitos e por manter a expressão recíproca (de ambos, PPAR- γ e C/EBP- α) em níveis elevados (MORRISON; FARMER, 1999; ROSEN; SPIEGELMAN, 2000).

1.1.2 Tecido adiposo marrom

O TAM é caracterizado por células que contém várias gotículas de gordura em seu citoplasma e maior número de mitocôndrias para efetuar a sua função principal: gerar calor (termogênese). As mitocôndrias do TAM, bem como do TAB utilizam substratos que seguem

para a cadeia de transporte de elétrons. Carbonos do acetil-CoA (provenientes da oxidação de glicose e ácidos graxos) entram no ciclo de Krebs na matriz mitocondrial, onde substratos são oxidados com a produção de dióxido de carbono (CO₂), nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e flavina adenina dinucleotídeo (FADH₂). Nesse processo ocorre o estabelecimento de um gradiente eletroquímico na membrana mitocondrial interna que será utilizado para a síntese de ATP, o qual é fundamental para funções celulares vitais. O TAM tem capacidade de desfazer esse gradiente eletroquímico pois possui a proteína desacopladora 1 (UCP1), antigamente denominada termogenina. Graças a essa proteína o potencial de membrana mitocondrial é desfeito e/ou diminuído, visto que os prótons têm agora um caminho alternativo para retornarem à membrana além da *ATP sintase*, a UCP1. Este processo (desacoplamento mitocondrial) resulta na produção de calor ao invés de síntese de ATP (BERTHOLET; KIRICHOK, 2017). O TAB tem menor quantidade de UCP1 e o aumento da produção da UCP1 no TAB tem sido alvo para terapias no combate à obesidade e doenças relacionadas, pois é uma forma de torná-lo mais termogênico (MAECHLER; WOLHEIM, 2001; CHAN, 2006; MARZZOCO; TORRES, 2010).

1.1.3 Surgimento de adipócitos marrons ou beges (browning) do tecido adiposo branco

O "escurecimento" (*browning*) do TAB, processo pelo qual adipócitos marrons (multiloculares e UCP1 positivos) aparecem em locais anatômicos característicos do TAB, sendo chamado de adipócito *brite* ou bege. Este fenômeno ocorre após um estímulo termogênico, como a exposição prolongada ao frio (YOUNG; ARCH; ASHWELL, 1984; COUSIN et al, 1992). O "*browning*" do tecido adiposo é caracterizado pelo aparecimento de adipócitos com fenótipo marrom no tecido adiposo branco ("*brown in white*"), através do recrutamento ou da conversão de adipócitos brancos em marrons (SUAREZ et al., 2013; MOISAN et al., 2014). O termo "transdiferenciação" é aplicado à transformação de uma célula diferenciada madura para um novo fenótipo, apresentando morfologia e fisiologia diferentes, sem passar pela desdiferenciação (BARBATELLI et al., 2010). Um tema interessante na investigação dos adipócitos é a possibilidade de transformar adipócitos brancos em adipócitos marrons. Este processo poderia reduzir o acúmulo de lipídios, prevenir a obesidade e diabetes, bem como aumentar a capacidade oxidativa do TAB, e já foi descrita em camundongos, ratos e adipócitos humanos (FARMER, 2008; BARBATELLI et al, 2010; CAMPIOLI et al, 2011; BORDICCHIA et al, 2012; BOSTRÖM et al, 2012; FISHER et al, 2012; KOPONEN et al, 2012; LIM et al, 2012).

Seale et al. (2008) propuseram que a gordura marrom e músculo esquelético surgiram a partir de uma célula progenitora comum expressando o fator de transcrição myf5, que não dá origem a adipócitos brancos. Tang e colaboradores (2008) propuseram que as células progenitoras no TAB residem da célula mural no compartimento da vasculatura adiposa mas não da vasculatura de outros tecidos. Tran et al. (2012) mostraram evidências de que depósitos de gordura, tanto brancos quanto marrons (murino e humanos) têm origem endotelial. Até o momento, não há um consenso claro sobre a gênese do TAB e do TAM. Foi demonstrado em camundongos que os adipócitos beges resultam de células progenitoras de adipócitos recém-diferenciadas (WANG et al., 2013). Após remoção dos estímulos, eles são mantidos no TAB, mas eles reverterem para um fenótipo branco mantendo a memória do programa bege que pode ser reativado automaticamente se necessário, em um processo de conversão direta (ROSENWALD et al., 2013). As células progenitoras beges não estão totalmente caracterizadas, mas seguramente, células progenitoras de adipócitos murais contribuem para o seu aparecimento em depósitos adiposos subcutâneos (VISHVANATH et al., 2016). Célula progenitora de adipócito mural é um subtipo de célula que expressa PDGFR α , além de marcadores de células tronco mesenquimais (Sca1, CD34) (RODEHEFFER et al., 2008) que estão na origem de todos os adipócitos presentes nos diferentes depósitos adiposos (BERRY; RODEHEFFER, 2013).

Outra hipótese é a existência de células progenitoras de adipócitos marrons (bege) dentro TAB. Eles não parecem ser derivados dos mesmos precursores que dão origem ao TAM, sugerindo que os adipócitos brancos (ou precursores) seriam capazes de sofrer algum tipo de reprogramação na expressão de genes para se tornar uma célula "*brown-like*" (WILSON-FRITCH et al, 2004; GESTA; TSENG; KAHN, 2007; SMORLESI et al, 2012). Outra proposta sugere a existência de um conjunto de pré-adipócitos beges que se diferenciam em adipócitos beges (não ativo), que poderiam ser ativados por estímulos de frio ou beta-adrenérgicos, bem como outros fatores (ROSENWALD; WOLFRUN, 2014). Parece que o depósito de adipócitos inguinal tem a maior propensão para recrutar adipócitos beges mediante a exposição crônica ao frio em ratos (ROSENWALD; WOLFRUM, 2014).

A indução de TAB em TAM conta com estímulo de parâmetros mitocondriais e o aumento do número ou da atividade dos adipócitos beges é descrita como uma estratégia promissora para o tratamento da obesidade. Esta indução é acompanhada por um aumento na expressão de UCP1 (HU et al., 2015; WU et al., 2012). Pan et al. (2014) descreveram que o TAB inguinal expressa um nível basal considerável de UCP1 apresentando grande plasticidade para o processo de *browning*. Corroborando estes trabalhos, Wu et al., (2012)

clonaram adipócitos beges de camundongos e descreveram que estas células possuem uma característica peculiar de expressão gênica: uma expressão basal muito baixa do gene que codifica a proteína UCP1 com a conservação de uma habilidade marcante de aumentar a expressão deste gene (mediante estímulo por AMPc); assim, ativaria o programa de respiração e gasto energético equivalente àquele do adipócito marrom clássico. Estes achados foram confirmados em outros estudos mediante estimulação apropriada incluindo fisiológica (exposição a frio ou dieta) (LEE et al., 2012; SAITO et al., 2009) ou condições farmacológicas (rosiglitazona e agonista β 3-adrenérgico) (GRANNEMAN et al., 2005; OHNO et al., 2012; SUAREZ et al., 2013). Semelhante aos adipócitos marrons clássicos, esse tipo de adipócitos possui uma alta densidade mitocondrial e capacidade respiratória através do desencadeamento da expressão de UCP1 estimulada de alguma forma (XUE et al., 2005; WU et al., 2012).

O nível de estimulação da expressão de UCP1 e o programa termogênico são controlados por vários fatores transcricionais identificados na diferenciação de adipócitos, incluindo o receptor coativador gamma 1 α do receptor ativado por proliferador de peroxisoma (PGC-1 α) (KLEINER et al., 2012), induzível pelo frio encontrado na gordura marrom. Ele regula a biogênese mitocondrial e o metabolismo oxidativo no TAM. Outros fatores de transcrição, tais como a proteína de interação do receptor 140 (RIP140) e a proteína co-ativadora do receptor esteroide SRC2/TIF2/GRIP1 modulam a atividade de PGC-1 α . A proteína contendo o domínio homólogo PRD1-BF-1-RIZ1 16 (PRDM16) é uma proteína de dedo de zinco de 140 kDa altamente expressa no TAM. É identificada como um interruptor molecular entre miócitos e adipócitos marrons. Aumenta as atividades transcricionais de PGC-1 α , PPAR- γ e C/EPBs através de interações diretas, promovendo assim a expressão de genes da gordura marrom, biogênese mitocondrial e aumento da respiração celular (SEALE et al., 2011). Vários reguladores, como EBF2 (*early B-cell factor 2*) e microRNAs como miR-133 e miR-193b, demonstram influenciar a atividade de PRDM16 (KAJIMURA; SAITO, 2014; HONDARES et al., 2011). Adipócitos termogênicos também foram identificados em depósitos brancos humanos (CYPESS et al., 2015).

1.2 Atividades metabólicas do tecido adiposo

1.2.1 Lipólise

A lipólise é via metabólica onde há a quebra da molécula de TAG por hidrólise. O produto dessa reação é 1 molécula de glicerol mais 3 AGs livres. Esse processo é coordenado

por enzimas lipolíticas, denominadas *lipases*, promovendo assim o catabolismo dos lipídios (LASS et al., 2011; TORTORA; DERRICKSON, 2014).

Primeiramente, o TAG encontra-se na gota lipídica, na forma de um lipídio anidro neutro. A enzima *lipase de triacilglicerol do adipócito* (ATGL – *adipocyte triglyceride lipase*) promove a hidrólise basal do TAG na gota lipídica, clivando TAG em DAG (diacilglicerol) mais 1 AG livre. A atividade da ATGL é aumentada na lipólise estimulada pelas catecolaminas. Na lipólise estimulada, os hormônios adrenalina e noradrenalina são responsáveis por promover / intensificar a lipólise nas células do tecido adiposo. Esses hormônios estimulam a *lipase hormônio sensível* (HSL – *hormone sensitive lipase*), pois quando se ligam à receptores beta-adrenérgicos acoplados à proteína G, desencadeiam uma cascata de sinalização envolvendo a ativação de proteína quinase A (PKA) por AMP cíclico (*cyclic Adenosine Mono-Phosphate* – cAMP). A PKA, por sua vez, fosforila e ativa a HSL, e esta promove a hidrólise de DAG em MAG (monoacilglicerol) e 1 AG livre, e por último a hidrólise de MAG em glicerol e 1 AG livre (DUCHARME; BICKEL, 2008; MARZZOCO; TORRES, 2010; TORTORA; DERRICKSON, 2014; KOLTES, SPURLOCK; SPURLOCK, 2017).

A PKA ativa, também fosforila a perilipina, que é uma família de proteínas presente na gota lipídica, funcionando como uma barreira para as *lipases*, e, portanto, “protege” a gota lipídica de lipólise, evitando assim a perda de lipídios pelo adipócito. Uma vez que a perilipina é fosforilada, o acesso das enzimas lipolíticas à gota lipídica é facilitado, ocorrendo assim a hidrólise do TAG. Foi demonstrado que a perilipina A, uma isoforma predominante dessa proteína promove acúmulo de TAG e diminui a taxa de hidrólise do TAG em adipócitos (BRASAEMLE et al., 2000, DUCHARME; BICKEL, 2008).

A clivagem completa do TAG libera AGs não esterificados, que subsequentemente podem ser utilizados como substratos energéticos para formação de ATP, precursores para a síntese de lipídios, bem como podem ser incorporados nas membranas plasmáticas, re-esterificados ou ainda utilizados como mediadores da sinalização celular (LASS et al., 2011).

1.2.2 Lipogênese

A lipogênese consiste na síntese do triacilglicerol. Este processo bioquímico utiliza basicamente AGs e glicose para a produção de um lipídio neutro, o TAG. A lipogênese se dá a partir de AGs provenientes da dieta ou a partir de substratos não lipídicos como os carboidratos (principalmente) e as proteínas, que são degradados até acetil-CoA e oxaloacetato. Estes substratos podem então ser convertidos a ácidos graxos a partir de uma via

metabólica conhecida como síntese *de novo* de AG (HARVEY; FERRIER, 2012; HIRABARA et al., 2015).

O TAG é composto por 3 ácidos graxos ligados por esterificação à uma molécula de glicerol. No processo de lipogênese, AGs são trazidos em forma de TAG pelos quilomicrons e pelas VLDLs (*very-low-density lipoprotein*), são hidrolizados pela lipase de lipoproteínas (LPL) presente no endotélio, que são então captados pelas células adiposas. Uma vez dentro do adipócito, ligam-se à proteína carreadora de AGs, a aP2 (*adipocyte Protein 2*), também conhecida como FABP4 (*fatty acid binding protein 4*) que vai carrear os AGs dentro do adipócito para ser esterificado ao glicerol-3-fosfato (glicerol-3-P). Esta forma é transportada pelo citosol até encontrar a enzima *acil-CoA sintetase*, que adiciona uma coenzima A (CoA) à molécula de AG, formando o acil-CoA. O acil-CoA por sua vez, liga-se à proteína carreadora de Acil-CoA (ACBP – *Acyl-CoA-binding protein*), e é carreado até os sítios de esterificação ao glicerol-3-P no retículo endoplasmático, onde haverá a formação do TAG. Para ser esterificado ao glicerol-3-P, o primeiro AG sofre ação da enzima *glicerol-3-fosfato aciltransferase* (*glycerol-3-phosphate dehydrogenase* – GPAT), formando o MAG. A enzima *1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferase* (*1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase* – AGPAT) adiciona mais um AG no MAG, formando então o DAG. Finalmente, o último AG é esterificado por ação da enzima *diacilglicerol aciltransferase* (*diacylglycerol acyltransferase* – DGAT), produzindo o TAG (apud PROENÇA et al., 2014).

A síntese *de novo* de AGs dá-se por excesso da produção de citrato, através do aumento da produção de acetil-CoA, proveniente do piruvato pela via glicolítica. O excesso de citrato formado deixa a mitocôndria e no citosol é convertido em oxaloacetato e acetil-CoA pela enzima *ATP citrato liase* (ACL). O acetil-CoA é convertido em malonil-CoA pela enzima *acetil-CoA carboxilase* (ACC), e a síntese do AG dá-se pela ação do complexo enzimático *ácido graxo sintase* (*fatty acid synthase* - FAS). O AG formado será esterificado no glicerol-3-P. A produção do glicerol-3-P provém da glicose. A glicose é captada pelos adipócitos via transportadores da glicose: GLUT-1 (basalmente) e GLUT-4 (sob estímulo de insulina). Uma vez dentro do adipócito, a glicose segue para a via glicolítica, onde há a formação de diidroxicetona fosfato e gliceraldeído-3 fosfato. O diidroxicetona fosfato é então convertido em glicerol-3-P pela enzima *glicerol fosfato desidrogenase* (GPD), produzindo o glicerol para formar o TAG (HIRABARA et al., 2015).

1.2.3 Oxidação de ácidos graxos

A oxidação de AGs é um processo de catabolismo de lipídios propriamente dito. AGs provenientes da lipólise, por exemplo, são “lançados” para dentro das mitocôndrias, para serem oxidados promovendo a formação de ATP. Os AGs são transportados para dentro das mitocôndrias pela *carnitina-acil transferase*. Exemplos de *carnitina acil transferases* são as CPT 1 e 2 (*carnitina palmitoil tranferase 1 e 2*, respectivamente), que promovem a entrada de ácido palmítico, nas mitocôndrias. A CPT1 transloca o AG para o espaço intermembranas mitocondrial, e transloca o acil para a CPT2, que por sua vez, transloca este acil para a matriz mitocondrial. No interior da mitocôndria, ocorre a oxidação do AG. A beta-oxidação ou ciclo de Lynen é a produção de Acetil-CoA a partir de AGs, e neste processo ocorre também a formação de FADH₂ e NADH, coenzimas reduzidas que vão doar os elétrons para a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, promovendo assim a formação de ATP. Durante o processo de beta-oxidação, o acil-CoA é convertido em trans-delta2-enoil-CoA pela enzima *acil-CoA desidrogenase*, tendo como cofator o FAD, que é reduzido na reação em FADH₂. A molécula de trans-delta2-enoil-CoA por sua vez, é convertida em L-Hidroxiacil-CoA pela enzima *enoil-CoA hidratase*, e este último produto é convertido em beta-Cetoacil-CoA pela enzima *beta-hidroxiacil-CoA desidrogenase*, tendo como cofator o NAD, que é reduzido na reação, formando NADH. Por fim, uma enzima *tiolase* converte a molécula de beta-Cetoacil-CoA em Acil-CoA (produto da primeira reação, com menos 2 carbonos na cadeia), que retorna ao ciclo de Lynen para ser oxidado novamente, e Acetil-CoA, que vai seguir para o ciclo de Krebs (WANG et al., 2003; MARZZOCO; TORRES, 2010).

A completa oxidação de acetil-CoA ocorre no ciclo de Krebs, produzindo CO₂. O acetil-CoA formado, entra no ciclo e juntamente com o oxaloacetato é convertido em citrato pela enzima *citrato sintase*. A partir daí, no ciclo de Krebs, há formação de NADH e FADH₂, coenzimas reduzidas, que por sua vez, doam seus elétrons para a cadeia de transporte de elétrons. O transporte de elétrons ocorre nos complexos mitocondriais: complexo I (NADH desidrogenase), complexo II (succinato desidrogenase), complexo III (ubiquinona-citocromo C óxido-redutase), complexo IV (COX ou citocromo C oxidase) e complexo V (ATP sintase). E a fosforilação oxidativa ocorre quando o gradiente eletroquímico na membrana mitocondrial é desfeito e a *ATPsintase* forma ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico (Pi) (WANG et al., 2003; HARVEY; FERRIER, 2012; ASHMORE et al., 2014).

1.3 Ácidos graxos e sua participação no metabolismo energético

Ácidos graxos são ácidos orgânicos, possuem uma cadeia carbônica principal com uma região terminal metil (CH_3) e uma extremidade com o grupo funcional carboxila (COOH). A cadeia carbônica pode ser saturada ou conter uma insaturação (monoinsaturada), duas ou mais insaturações (poli-insaturada). AGs livres dificilmente são encontrados no organismo sob esta forma; geralmente estão ligados a um álcool, podendo ser o glicerol (triacilgliceróis e glicerofosfolipídios) ou a esfingosina (esfingolipídios). Enquanto que os triacilgliceróis são considerados como forma de armazenamento de ácidos graxos (lipídeos neutros), os glicerofosfolipídios e os esfingolipídios, juntamente com o colesterol, fazem parte das membranas celulares (MARZZOCO; TORRES, 2010).

Os AGs insaturados podem ser nomeados a partir da nomenclatura ômega (ω ou n), que conta os carbonos a partir da região terminal metil da cadeia carbônica. Essa nomenclatura permite a identificação da posição das duplas ligações presentes na molécula. Portanto, um ácido graxo que possui uma insaturação entre os carbonos ômega 3 e 4 é do tipo ômega-3 (ω -3), e se possuir uma insaturação entre os carbonos ômega 6 e 7 é tipo ômega-6 (ω -6), bem como se possuir uma insaturação entre os carbonos 7 e 8 é do tipo ômega-7 (ω -7). Além disso, deve-se também indicar o número de carbonos, bem como o número de insaturações presentes na cadeia carbônica, como por exemplo o ácido palmitoleico, com 16 carbonos e monoinsaturado, é representado da seguinte maneira: C16:1 ω -7 (ou n-7); e o ácido linoleico, com 18 carbonos e poli-insaturado, é representado da seguinte forma: C18:2 ω -6 (ou n-6) (HIRABARA et al., 2015).

1.3.1 O ácido palmitoleico

As principais fontes vegetais do ácido palmitoleico (16:1n7) são o óleo de semente de macadâmia (cerca de 30% do total) e a polpa de espinheiro-marítimo (entre 20 e 30%) (KAJSER; DUTTA; SAVAGE, 2000; KALLIO et al., 2002). Sua concentração na dieta da população, em geral, é baixa, mas os adipócitos são capazes de produzi-lo através da dessaturação do ácido palmítico (C16:0), que ocorre pela ação da enzima *estearoil-CoA desaturase-1* (SCD-1). Dessa forma, este AG é tido como um marcador da síntese *de novo* de AG. O ácido palmitoleico foi descrito em 2008 como um hormônio lipídico ou “lipocina”, sintetizada e secretada pelos adipócitos (CAO et al., 2008). Foi demonstrado que ele desempenha uma função citoprotetora, prevenindo a morte de células beta pancreáticas (DIAKOGIANNAKI et al., 2007; MORGAN; DHAYAL, 2010) e promovendo um aumento

da sensibilidade à insulina no músculo esquelético e fígado com redução da esteatose hepática (CAO et al., 2008).

Este novo agente regulador da homeostase metabólica parece ter sua produção modulada pelas FABPs. Uma dieta rica em gorduras causa redução na concentração de 16:1n7 no tecido adiposo de animais selvagens, enquanto houve apenas uma ligeira queda nos animais *knockout* em FABP (CAO et al., 2008). Além disso, camundongos *knockout* em FABP4 e FABP5 (FABP^{-/-}) específicas do TAB exibem sensibilidade aumentada à insulina e são protegidos da síndrome metabólica induzida por dieta rica em lipídios. Foi traçado o perfil lipídico plasmático nos animais *knockout* destas duas proteínas: dentre os vários AG pesquisados (400 espécies diferentes), foi identificado alto teor de 16:1n7 (MAEDA et al., 2005).

Dimopoulos e colaboradores (2006) verificaram que células musculares tratadas com 16:1n7 apresentam aumento da captação de glicose devido à maior expressão de GLUT-1 e GLUT-4. Quando o tratamento é realizado em associação com o ácido palmítico, os efeitos do palmitoleico foram mantidos. Observou-se também, que o 16:1n7 reduz a ativação do promotor da SCD-1 no fígado. Este achado revela um sistema de retroalimentação negativa no qual o ácido palmitoleico inibe a expressão de SCD-1. Isto resulta na redução na lipogênese *de novo* e esteatose hepática melhorando a ação de insulina nos hepatócitos (CAO et al., 2008).

A concentração do 16:1n7 no plasma de humanos após uma noite em jejum é de 52 µM (FRASER et al., 1999). Em estudos clínicos concentrações elevadas de 16:1n7 no plasma de crianças e adultos obesos foram detectadas. Esses indivíduos também apresentam aumento da atividade da SCD-1 (OKADA et al., 2005; KUNESOVÁ et al., 2002). Hiraoka-Yamamoto e colaboradores (2004) relataram que mulheres japonesas jovens submetidas à dieta rica em óleo de macadâmia têm concentrações séricas de colesterol total e de LDL significativamente diminuídas, assim como o peso e o índice de massa corpórea.

Hodge et al. (2007) realizaram um estudo com um grande grupo de homens e mulheres e fizeram análise da composição de AG na dieta e no plasma. Eles mostraram que a concentração de ácido palmitoleico presente no plasma é de 2,2% em ambos os grupos. Garaulet et al. (2011) mostraram que há uma diminuição na concentração de ácido palmitoleico na dieta de indivíduos obesos, de 2,51% em indivíduos com sobrepeso, para 1,17% em obesos (porcentagem do total de gordura presente na dieta). É importante salientar, que mesmo estando pouco presente na dieta, sua concentração no organismo se dá também por síntese endógena, sendo esta via a de maior importância (BHATTACHARYYA et al.,

1987; HODSON; SKEAFF; FIELDING, 2008; HODSON; KARPE, 2013). De forma interessante, Hodson e Karpe (2013) mostraram que o tecido adiposo subcutâneo do braço e da região gluteofemoral tem maior concentração de ácido palmitoleico comparado à concentração deste AG em depósitos viscerais.

Em um modelo experimental de diabetes tipo 2 espontâneo (camundongos *knockout* KK-A^y), o tratamento por 4 semanas com ácido palmitoleico (300 mg/ kg/ dia) promoveu aumento da sensibilidade à insulina, diminuiu a curva glicêmica no teste de tolerância à glicose (GTT) e a concentração de insulina no plasma. Além disso, o 16:1n7 diminuiu a concentração de triglicerídeos no plasma e reduziu a expressão gênica da FAS, SREBP-1, SCD-1, TNF- α e resistina (YANG, MIYAHARA e HATANAKA, 2011).

Por fim, em um modelo de obesidade induzida por dieta HL durante 12 semanas em camundongos C57BL/6 machos, o tratamento com ácido palmitoleico (300 mg/ kg/ dia) por 2 semanas promoveu melhora nos testes de GTT e ITT, indicando que neste modelo de obesidade, o ácido palmitoleico melhora a sensibilidade à insulina (SOUZA et al., 2014).

1.4 Obesidade, doenças relacionadas e perspectivas de tratamento com o ácido palmitoleico

A obesidade é resultante da expansão do TAB, onde ocorre aumento da massa corpórea por conta de um balanço energético positivo, que influencia o mal funcionamento do tecido. Na obesidade, os adipócitos ficam hipertróficos pelo aumento da captação de AGs e/ou aumento da síntese *de novo* de AGs através da glicose, desta forma aumentando a lipogênese, ou seja, a incorporação de AGs em TAG na gota lipídica. Sabe-se que a obesidade pode desencadear doenças e induzir o indivíduo à síndrome metabólica. Nesta condição, o indivíduo comumente apresenta dislipidemias, resistência à insulina, hipertensão, nefropatias, dentre outras complicações decorrentes da obesidade. Problemas na sinalização da insulina em tecidos periféricos como o fígado, músculo e tecido adiposo é o principal fator para o desenvolvimento da síndrome metabólica e pode promover doença cardiovascular através do metabolismo anormal da glicose e lipídios, podendo causar também hipertensão e um estado inflamatório crônico no indivíduo, além do diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (YAMANAKA et al., 2007; RASK-MADSEN; KAHN, 2012, SÁ et al., 2016).

Alterações nos mecanismos de sinalização da insulina contribuem para muitos aspectos da síndrome metabólica, provocando falha na supressão e regulação do apetite, recrutamento de macrófagos, produção de citocinas inflamatórias como o TNF- α e IL-6, bem

como promove uma progressão da intolerância à glicose em células beta pancreáticas, alterações endoteliais como a vasoconstrição, além da hiperinsulinemia, que pode causar excesso de atividade simpática e hipertensão, sem contar outras doenças cardiovasculares, que provocam inflamação e aterosclerose (RASK-MADSEN; KAHN, 2012).

Em relação ao controle de ingestão e apetite, a leptina, que é um hormônio produzido no tecido adiposo, é liberada no sangue e age nos receptores anorexígenos no cérebro promovendo a saciedade. Um estudo mostra que além da leptina, fatores neurotróficos participam do controle da saciedade, ingestão alimentar e ganho de peso (LIAO et al., 2012; IWASA et al., 2016; XU e XIE, 2017; GUZZARDI et al., 2017). A obesidade desencadeia resistência à ação da leptina, o que impede a sua sinalização. No cérebro, isso pode induzir a diminuição da expressão desses fatores neurotróficos nos neurônios, potencializando a resistência à insulina e intolerância à glicose. O estudo de Liao e colaboradores (2012) mostrou que o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF – *Brain-derived neurotrophic factor*) é necessário para a atividade neuronal induzida por leptina em várias áreas hipotalâmicas, e que quando a sinalização do BDNF é comprometida, circuitos neurais nessas áreas hipotalâmicas são disfuncionais, levando a resistência à leptina e à obesidade.

A epidemia mundial de obesidade justifica o aumento crescente de pesquisas voltadas para a compreensão da biologia de adipócitos e os eventos que ocorrem no TA de indivíduos obesos. Evidências acumuladas indicam que a obesidade causa inflamação crônica de baixo grau no TAB, que exerce papel central no desencadeamento das disfunções metabólicas sistêmicas associadas aos transtornos ligados à obesidade. Assim, estratégias terapêuticas que tenham como alvo o TAB ou mais especificamente, os adipócitos, ganham considerável atenção. A incidência de pessoas obesas em todo o mundo está aumentando a cada ano e esse é um indicador de que as estratégias utilizadas até aqui ainda não são totalmente efetivas.

Apesar dos efeitos benéficos do ácido palmitoleico descritos no fígado, músculo esquelético e células beta pancreáticas, bem como a melhora do perfil lipídico e glicídico em roedores e humanos, seus efeitos em adipócitos ainda não são claros. Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou efeitos deste AG em adipócitos brancos: o tratamento agudo (por 24 horas) de adipócitos maduros com 16:1n7 promoveu um aumento da atividade lipolítica e do conteúdo das duas maiores lipases (ATGL e HSL) através de um mecanismo dependente de PPAR- α (BOLSONI-LOPES et al., 2013) e um aumento de captação de glicose bem como do conteúdo de GLUT-4 através de um mecanismo que inclui a ativação de AMPK (BOLSONI-LOPES et al., 2014). Adicionalmente, empregando células 3T3-L1

tratadas cronicamente com ácido palmitoleico, descrevemos que, *in vitro*, o 16:1n7 aumenta a capacidade oxidativa de adipócitos brancos incluindo alguns parâmetros bioenergéticos como o aumento do consumo de oxigênio, o conteúdo de ATP e a beta-oxidação (CRUZ et al., 2018). Observamos ainda um aumento da lipólise, simultaneamente à reesterificação de AGs, bem como um aumento na captação e oxidação de AGs em adipócitos peri-epididimais de camundongos e em linhagem de adipócitos 3T3-L1 (BOLSONI-LOPES et al., 2013; 2014; CRUZ et al., 2018). Assim, o ácido palmitoleico parece estar relacionado com o aumento do metabolismo energético de adipócitos 3T3-L1, aumentando parâmetros metabólicos e mitocondriais destas células.

Como mencionado, diversos estudos recentes empregando roedores e seres humanos demonstram a capacidade de indução de fenótipo do TAM em TAB sob estímulos de frio ou farmacológico. Uma vez que o aumento da capacidade termogênica está relacionado com aumento do consumo de oxigênio, aumento de lipólise, de lipogênese e aumento da capacidade oxidativa do tecido adiposo, o ácido palmitoleico seria um forte candidato a promover o *browning* do tecido adiposo branco. Assim, formulamos a hipótese de que o ácido palmitoleico seja capaz de induzir um programa termogênico no TAB. Hipotetizamos ainda que ele possa atenuar os efeitos desencadeados pela obesidade no que tange ao metabolismo energético de células adiposas brancas e marrons.

Com base no exposto acima, consideramos importante a investigação sobre os efeitos do ácido palmitoleico em um modelo de obesidade induzida por dieta.

2. JUSTIFICATIVA

A obesidade é uma epidemia e está associada a várias doenças e a perspectiva no cenário mundial é de piora nos próximos anos. Em relação aos estudos apresentados até o momento, a busca por novas terapias e estratégias eficazes para conter a obesidade é incessante. O ácido palmitoleico mostrou-se eficaz no tratamento de animais diabéticos, além de diminuir a esteatose hepática e melhorar a sensibilidade à insulina no músculo, no fígado, no TAB e atenuar efeitos imunometabólicos causados pela dieta HL. Adicionalmente, demonstramos recentemente que este AG aumenta o metabolismo basal de adipócitos da linhagem 3T3-L1, através de análises de parâmetros bioenergéticos *in vitro*; se estes efeitos ocorrem *in vivo* e se estas alterações levam ao *browning* do TAB, também é um aspecto que precisa ser esclarecido.

Portanto, consideramos de extrema relevância estabelecer os efeitos do ácido palmitoleico no tecido adiposo branco (TAB) e marrom (TAM) sob o desafio (ou não) da obesidade induzida por dieta HL, com o intuito de investigar a hipótese de que este AG possa impedir e/ou amenizar os efeitos da HL, seja por indução de *browning* no TAB, seja por aumento do metabolismo energético de células adiposas ou mesmo por exercer efeitos anti-inflamatórios.

3. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos metabólicos e gênicos do ácido palmitoleico no tecido adiposo branco e marrom de camundongos C57BL/6 submetidos (ou não) à dieta rica em lipídios.

3.1 Estratégias Experimentais

Em animais submetidos (ou não) à dieta hiperlipídica, foi investigado:

- A ingestão alimentar, a massa corporal e a adiposidade;
- A eficiência alimentar e energética;
- A concentração de triglicérides (TG) no fígado;
- O diâmetro dos adipócitos do TAB subcutâneo e visceral;
- A concentração de glicose, triglicerídeos, colesterol total e frações no plasma dos animais;
- As atividades metabólicas do TAB (lipólise, lipogênese, captação de glicose e oxidação de ácidos graxos);
- A expressão dos genes que codificam proteínas envolvidas em atividades metabólicas (ATGL, HSL, Perilipina, LPL, FABP4, Lipina, FAS, ACC1, GLUT-4, Leptina, Adiponectina), mitocondriais (CPT1, NRF1, TFAM, PGC-1 α), inflamatórias (MCP1, TNF- α e NOS2), na atividade antioxidante (GPX, Catalase, SOD1 e SOD2), na adipogênese (C/EBP- α , PPAR- γ , Pref-1 e C/EBP- β) e no *browning* (UCP1 e PRDM16) do TAB;
- A expressão dos genes que codificam proteínas que participam de funções metabólicas (Perilipina, FAS, GLUT-4), mitocondriais (CPT1, TFAM, PGC-1 α , PRDM16 e UCP1) e na adipogênese (C/EBP- α , PPAR- γ) do TAM.
- Análise de citocinas no TAB subcutâneo (TNF- α e Adiponectina) e no visceral (Adiponectina) por ELISA.

Em cultura de linhagem celular de pré-adipócitos 3T3-L1 tratadas com ácido palmitoleico, foi investigado:

- A expressão dos genes que codificam proteínas marcadoras de adipócitos beges e função mitocondrial (UCP1, PRDM16, TFAM, CPT1 e PGC1 α) após indução de *browning* com coquetel próprio específico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Modelos experimentais

Camundongos C57Bl/6 machos de 8 semanas procedentes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) foram utilizados neste estudo. Todos os procedimentos realizados com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo, através da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEP 062/12 e 8347020315). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (3-4 animais por caixa), a uma temperatura ambiente constante ($24\pm 1^{\circ}\text{C}$), com ciclo artificial claro/escuro de 12h, tendo livre acesso à ração e água. Após período de adaptação de uma semana, os animais foram submetidos aos protocolos experimentais descritos a seguir.

Adicionalmente, pré-adipócitos 3T3-L1 foram empregadas para experimentos *in vitro*, a fim de complementar os efeitos do ácido palmitoleico sobre o processo de *browning*.

4.1.1 Protocolo experimental 1

Os camundongos foram divididos em dois grupos experimentais:

- grupo CO (que receberam gavagem diária com água), e
- grupo 16:1n7 (que receberam gavagem diária com ácido palmitoleico (300mg/kg/ dia) por 4 semanas.

Durante o período de protocolo experimental, os animais consumiram dieta Nuvilab e água a vontade. O peso dos animais e o consumo alimentar foram monitorados semanalmente. O ganho de massa corporal foi obtido a partir da diferença entre o peso (em gramas) final e o inicial do protocolo. A medida da ingestão alimentar foi feita por meio da diferença entre a quantidade de dieta oferecida e a sobra da mesma, e os resultados foram expressos em g/dia/animal. Pela razão entre ganho de peso corpóreo (em gramas) e consumo alimentar (em gramas), calculou-se a eficiência alimentar. A eficiência energética também foi calculada pela razão entre ganho de massa corporal (em gramas) pelo consumo energético (em Kcal).

Após 4 semanas de gavagens diárias, os animais foram submetidos a um jejum de 10-12 horas e então expostos ao anestésico volátil isoflurano (Isoforine®, Cristália). Após a verificação e constatação da anestesia ser efetiva, o sangue foi coletado pelo plexo retro-orbital sem anticoagulante que foi centrifugado a 3000 g, por 20 minutos, a 4°C e o soro devidamente coletado e armazenado em freezer a -80°C para análises posteriores. Os animais

foram submetidos à eutanásia mediante decapitação com guilhotina. Foram retirados o TAM interscapular e o TAB, tanto o subcutâneo da região inguinal (SUB), como os viscerais das regiões retroperitoneal (RP) e peri-epididimal (EPI), além de fígado e coração. Os tecidos foram pesados e processados para extração de RNA e análises de expressão gênica ou para isolamento dos adipócitos para análises morfométricas e a realização dos respectivos testes biológicos.

4.1.2 Protocolo experimental 2

Após o protocolo experimental 1 decidimos trabalhar com um protocolo com duas variáveis: 1) dieta [controle (CO) e hiperlipídica (HL)] e 2) suplementação (H₂O ou 16:1n7). A dieta HL contém 59% de energia proveniente de lipídios, enquanto que a dieta controle, 9%. Detalhes do preparo e composição das dietas foram descritos pelo nosso grupo (SÁ et al., 2016) e segue na Tabela 1. Foram empregados 36 animais para estudar os parâmetros descritos adiante.

A dieta experimental foi oferecida desde o início do protocolo, que totalizaram 8 semanas. Nas primeiras 4 semanas, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos:

- grupo Controle (que receberam dieta CO), e
- grupo Obeso (que receberam dieta HL);

Com o objetivo de reverter e/ou prevenir os efeitos desencadeados pela dieta HL, nas 4 semanas seguintes, ou seja, a partir da 5^a semana do protocolo experimental, metade dos animais do grupo obeso (HL) foram suplementados com ácido palmitoleico [por gavagem, 300 mg /Kg /dia (aproximadamente 10 µL/camundongo), diariamente], simultaneamente à dieta HL. Assim, um terceiro grupo de animais foi criado:

- grupo Obeso+16:1n7 (que receberam dieta HL e foram suplementados com ácido palmitoleico).

Os grupos Controle e Obeso receberam água (também por gavagem). O consumo alimentar e a massa corpórea foram mensurados semanalmente.

Ao final do protocolo experimental, ou seja, após 8 semanas de administração de dieta HL e 4 semanas de suplementação com 16:1n7, os animais foram submetidos a um jejum de 10-12 h e então anestesiados e submetidos à eutanásia, como descrito acima (item 4.1.1). Os mesmos parâmetros foram avaliados e os mesmos tecidos foram retirados e pesados, sendo o TAM e os TAB SUB, RP e EPI processados para os estudos descritos adiante.

Tabela 1. Composição das dietas utilizadas no protocolo experimental 2.

| Ingredients | CO | HF |
|-----------------------|-------|-------|
| (g kg ⁻¹) | | |
| Starch | 465.7 | 115.5 |
| Casein | 140 | 200 |
| Dextrinized starch | 155 | 132 |
| Sucrose | 100 | 100 |
| Soybean oil | 4 | 35 |
| Lard | 36 | 315 |
| Cellulose | 50 | 50 |
| Mineral mix | 35 | 35 |
| Vitamin mix | 10 | 10 |
| Cistine | 1.8 | 3 |
| Choline bitartate | 2.5 | 2.5 |
| kcal (%) | | |
| Protein | 15 | 15 |
| Carbohydrate | 76 | 26 |
| Fat | 9 | 59 |

Fonte: SÁ et al., 2016.

4.1.3 Protocolo experimental 3

Pré-adipócitos da linhagem celular 3T3-L1 (células oriundas de embriões de camundongos *Swiss* extraídas prematuramente) foram cultivados em D'MEM suplementado com 10% de soro de bezerro -CS e mantidos em estufa com 5% de CO₂, 37 °C até atingirem a confluência (dia -2). Após 2 dias de confluência, as células foram estimuladas a se diferenciarem (dia 0).

4.1.3.1 Diferenciação das células 3T3-L1

A diferenciação (adipogênese) foi induzida mediante o tratamento das células com coquetel adipogênico composto de 0,5mM MIX (3-isobutyl-1-methylxanthine), 1 µM dexametasona e 1,67 µM insulina, D'MEM acrescido de soro bovino fetal -FBS 10% (meio de diferenciação). Após 48 horas, o meio foi trocado para o mesmo D'MEM (10% FBS) contendo 0.4 µM insulina (meio de manutenção), sendo este renovado a cada 2 dias (Moldes et al., 2003).

4.1.3.2 Indução de *browning*

Para estimular *browning* nos adipócitos, o meio de diferenciação foi suplementado com 50 nM de triiodotironina (T3), que também foi adicionado ao meio de manutenção juntamente com 1µM de rosiglitazona [coquetel para *browning* (SEO et al., 2018; CHOI et al., 2017)].

4.1.3.3 Tratamento das células com os ácidos graxos

As células receberam um dos três tratamentos: 100 µM de ácido palmítico (C16:0), 100 µM de ácido palmitoleico (16:1n7) ou etanol (veículo). Adicionalmente, um grupo recebeu apenas o coquetel de diferenciação (sem a adição de T3 e rosiglitazona), sendo este o grupo controle negativo para *browning*.

As concentrações de AGs foram pré-definida por testes de citotoxicidade (CRUZ et al., 2018) e adicionados às células juntamente com o coquetel de diferenciação celular (dia 0), que foram mantidos até o final das culturas.

No dia 7 (D7) pós-diferenciação, a cultura foi interrompida e as células foram coletadas para estudos de expressão gênica mediante extração de RNA, síntese de cDNA e reação em cadeia da *polimerase* em tempo real (RT-PCR).

4.2 Dosagem de triglicérides no fígado

Após laparotomia dos animais no dia da eutanásia, fragmentos do tecido hepático foram retirados. Cerca de 0,4 g de tecido foi colocado em tubo de ensaio com 0,5 mL de metanol + 1,0 mL de clorofórmio e homogeneizados em polytron (PT 3100, Kinematica AG) por 30 s e colocadas sobre gelo. O material foi alíquotado em tubos de 1,5 mL e armazenados em freezer a – 20 °C para posterior extração dos lipídeos.

Para a extração, foi adicionado ao homogenato 0,4 mL de PBS e a amostra foi então centrifugada a 12000 rpm por 1 min (“spin”) a 4 °C. A fase inferior da solução (extrato clorofórmico) foi transferida para outro tubo e mantido em gelo, o restante passou por uma fase de reextração. Foram adicionados: 0,5 mL de metanol, 0,5 mL de clorofórmio e 0,4 mL de PBS. A mistura foi centrifugada a 12000 rpm por 1 min (“spin”) a 4 °C. Os dois extratos clorofórmicos foram unificados e foi acrescentado 0,5 mL de Folch (clorofórmio/metanol/água, na proporção de 3:48:47). A mistura foi homogeneizada em vórtex e a fase aquosa superior foi descartada com auxílio de trompa a vácuo para obtenção do extrato contendo os lipídeos totais. O sedimento foi seco em Speed Vac (Savant, RT-490, Farmingdale, NY, Estados Unidos) para obtenção do *pellet*. As amostras foram armazenadas

em freezer a -20°C para posterior dosagem de TAG. Para determinação do TAG, os *pellets* foram dissolvidos em 250 μL de solução SDS 1% e homogeneizados em vórtex. Os TAG foram determinados pelo método enzimático-colorimétrico (GPO/POD). Para este ensaio foi utilizado o kit de dosagem de triglicérides (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil).

4.3 Isolamento dos Adipócitos

Os adipócitos foram isolados dos TAB subcutâneo inguinal e retroperitoneal mediante a técnica de digestão do tecido pela *colagenase*, descrita por Rodbell (1964), com algumas modificações para adaptar o método às nossas condições laboratoriais. Em resumo, as gorduras foram incubadas em 4 mL de tampão digestivo (DMEM, HEPES 25 mM, BSA 4%, colagenase tipo II [Sigma Chemical, St. Louis, MO, Estados Unidos] 1,25 mg/mL, pH 7,45), por cerca de 60 minutos, a 37°C , em banho-maria, com agitação orbital (150 rpm). Em seguida, as amostras foram filtradas em peneira plástica com malha fina (que retém restos teciduais e vasos não digeridos) e lavada por três vezes com 25 mL de tampão EHB (sais de EARLE, HEPES 25 mM, BSA 1%, piruvato de sódio 1 mM, sem glicose, pH 7,45).

4.4 Dosagens plasmáticas

As concentrações do colesterol total, colesterol HDL e triglicérides foram determinadas no soro através de kits comerciais (Labtest Diagnóstica de Lagoa Santa, MG, Brasil). A concentração de VLDL-colesterol foi calculada a partir da equação de Friedewald (FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972) obedecendo aos requisitos que garante a confiabilidade dos resultados: 1) a concentração de TAG deve ser menor que 400 mg/dL; 2) a amostra não deve conter quilomícrons e hiperlipoproteinemia).

Equação de Friedewald:

$$1) \text{ VLDL - colesterol} = \text{TAG}/5$$

$$2) \text{ Colesterol Total} = \text{HDL-colesterol} + \text{LDL-colesterol} + \text{VLDL-colesterol}$$

Adicionalmente, a concentração de LDL foi calculada pela fórmula: $[\text{LDL}] = [\text{colesterol total} - \text{colesterol HDL}] - [\text{triglicérides}/5]$.

4.5 Lipólise

Esta atividade metabólica foi avaliada mediante determinação da concentração de glicerol liberado pelas células do TAB SUB e RP dos animais, como descrito por Alonso-Vale et al. (2008). A lipólise foi mensurada pela liberação de glicerol pelos adipócitos para o

meio de incubação em condições basais (não-estimuladas) e estimuladas com isoproterenol (2×10^{-6} M). Adipócitos primários subcutâneos (SUB) ou retroperitoneais (RP) (40 uL do homogenato de células) foram incubados em tampão Krebs/Ringer/fosfato (pH 7.4) contendo BSA (20 mM) e glicose (5 mM) por 30 minutos a 37 °C. Aliquotas (50 µL) do meio de incubação das células foram coletadas para a determinação da concentração de glicerol liberado.

O meio de incubação dos adipócitos foi centrifugado em 0 °C por 5 minutos a 7000 rpm. Aliquotas de aproximadamente 100 µL do infranadante foram coletadas para a determinação da concentração de glicerol liberado pelas células por método enzimático-colorimétrico (Sigma-Aldrich - Free Glycerol Determination Kit, St. Louis, Estados Unidos). Os resultados foram expressos em nmol de glicerol/ 10^4 células.

4.6 Captação de [^3H]-2-Deoxi D-glicose

Adipócitos subcutâneos foram incubados na ausência ou presença de insulina (100 nM), *ex vivo*, em tampão composto de 20 mM de HEPES, 140 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 2,5 mM de MgSO_4 , 1 mM de CaCl_2 , 1% de BSA (pH 7,4), durante 20 minutos a 37 °C. No final do período de incubação, [^3H]-2-Deoxi D-glicose (0,4 mmol/L, 1850 Bq/tubo) foi adicionado e a reação ocorreu por exatamente 3 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 250 µL de *phloretin* (0,3 mmol/L em tampão HEPES e DMSO 0,05%). A reação foi interrompida no gelo. Aliquotas de 200 µL foram transferidas para tubos de 1,5 mL contendo 200 µL de óleo de silicone (densidade de 0,963 mg/mL) e centrifugados por 10 segundos a 11.000 g. As células residentes no topo da camada de silicone foram recolhidas e transferidas para tubos contendo coquetel de cintilação biodegradável (EcoLumeTM, ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA, EUA) para a medida da radioatividade beta (1450 LSC, Couter MicroBeta, Trilux; PerkinElmer). Os resultados foram expressos como pmol de glicose captada pelas células em relação a área de superfície (pmol/cm²).

4.7 Ensaios de Incorporação de [1 – C¹⁴] Palmitato em TAG e Oxidação a CO₂

Aliquotas de 50 uL da suspensão de adipócitos isolados do TAB dos camundongos foram suspensas a 20% em solução tampão Krebs/Ringer/Fosfato/BSA 1%/ glicose 5mM, pH 7,4 a 37 °C, saturado em uma mistura gasosa de carbogênio 5%, contendo palmitato uniformemente marcado com [1-C¹⁴]-Palmitato (2 mM, 1850 Bq/tubo). Esta mistura permaneceu incubada a 37 °C durante um período de 1 hora e meia. O ácido sulfúrico (H_2SO_4) 8N então, foi adicionado, com a finalidade de provocar a ruptura das células e liberar

o CO₂ resultante da reação. Este CO₂ foi coletado e retido por adsorção em tiras (2,0 x 4,0cm) de papel de filtro embebido em solução de etanolamina (0,2 mL). O papel filtro então foi transferido para pequenos frascos contendo líquido de cintilação e o contador beta quantificou a radioatividade presente, determinando o grau de oxidação de palmitato.

A lipogênese consiste na extração de lipídios mediante o emprego do reagente de Dole (isopropanol:n-heptano:H₂SO₄ 8N; 4:1:0,25; v:v:v). Após a extração, 500 uL da fase superior da mistura foram transferidos para frascos de cintilação e o grau de radioatividade incorporada foi obtida pela leitura em contador beta.

4.8 Extração do RNA total, transcrição reversa para síntese de cDNA e reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR)

O RNA total foi isolado a partir do tecido adiposo de camundongos ou a partir das células em cultura, usando o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e o kit RNAeasy (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total com o kit da Superscript III (Invitrogen), que foi utilizado para amplificação por PCR em tempo real (qPCR) com kit SyberGreen (Sigma, USA), seguindo recomendações dos fabricantes. A expressão do gene GAPDH foi utilizada como controle interno da reação. As sequências dos *primers* bem como as respectivas temperaturas de anelamento requeridas para amplificação dos mesmos são descritas na Tabela 2. A análise dos resultados foi realizada utilizando-se o software disponibilizado pelo fabricante e a forma de quantificação relativa (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Resumidamente, o número arbitrário de cópias dos genes de interesse e constitutivos foram calculados pela fórmula ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) para cada amostra, onde CT é o número de ciclos de amplificação necessários para atingir o limiar determinado na fase exponencial da curva (RADONIC et al. 2004). Todas as amplificações foram realizadas com a curva de dissociação, “melting”, para verificação da especificidade da amplificação e confirmar a ausência de formação de dímeros de oligossondas ou qualquer outro produto inespecífico.

Tabela 2. Sequências *sense* e *antisense* dos primers utilizados na RT-PCR em tempo real.

| Gene | 5' Primer (5'-3') - <i>Sense</i> | 3' Primer (5'-3') - <i>Antisense</i> | Annealing |
|--------------|----------------------------------|--------------------------------------|-----------|
| <i>Gapdh</i> | CCACCACCCTGTTGCTGTAG | CTTGGGCTACACTGAGGACC | 60 °C |
| <i>36b4</i> | TAAAGACTGGAGACAAGGTG | GTGTACTCAGTCTCCACAGA | 60 °C |
| <i>18s</i> | GGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCG | CTGAACGCCACTTGTCCCTC | 60 °C |

| | | | |
|---------------------|-------------------------|--------------------------|-------|
| <i>Tfam</i> | GGAATGTGGAGCGTGCTAAAA | TGCTGGAAAAACACTTCGGAATA | 60 °C |
| <i>Nrf1</i> | CGCAGCACCTTTGGAGAA | CCCGACCTGTGGAATACTTG | 60 °C |
| <i>Ucp1</i> | ACTGCCACACCTCCAGTCATT | CTTTGCCTCACTCAGGATTGG | 60 °C |
| <i>Pgc1-α</i> | ATCTACTGCCTGGGGACCTT | ATGTGTGCGCTTCTTGCTCT | 60 °C |
| <i>Prdm16</i> | CAGCACGGTGAAGCCATTC | GCGTGCATCCGCTTGTG | 60 °C |
| <i>Atgl</i> | GGTCCTCTGCATCCCTCCTT | CTGTCCTGAGGGAGATGTC | 60 °C |
| <i>Hsl</i> | GGGAGGGCCTCAGCGTTCTCACA | ATAGCACGGAGCTGGGTGAGGG | 60 °C |
| <i>Perilipina</i> | AGTGTGGGGTCCTTGGGCGT | TGGCAGCTGTGAACTGGGTGG | 60 °C |
| <i>Lpl</i> | GGCCAGATTCATCAACTGGAT | GCTCCAAGGCTGTACCCTAAG | 60 °C |
| <i>Fabp4</i> | AAGGTGAAGAGCATCATAACCCT | TCACGCCTTTCATAACACATTCC | 60 °C |
| <i>Lipina</i> | TGATGTGGTGTTCACTGTCCT | TCGTTGACCCAGTGCAGGTA | 60 °C |
| <i>Fas</i> | AGAGGCTTGTGCTGACTTCC | GTGGCTTCGGCGATGAGAG | 60 °C |
| <i>Acc1</i> | GAGAGGGGTCAAGTCCTTCC | ACATCCACTTCCACACACGA | 60 °C |
| <i>Glut-4</i> | CATTCCCTGGTTCATTGTGG | GAAGACGTAAGGACCCATAGC | 60 °C |
| <i>Leptina</i> | CATCTGCTGGCCTTCTCCAA | ATCCAGGCTCTCTGGCTTCTG | 60 °C |
| <i>Adiponectina</i> | GCAGAGATGGCACTCCTGGA | CCCTTCAGCTCCTGTCATTCC | 60 °C |
| <i>C/EBP-α</i> | CGCAAGAGCCGAGATAAAGC | CAGTTCACGGCTCAGCTGTTC | 60 °C |
| <i>Ppar-γ2</i> | GCATCAGGCTTCCACTATGGA | AAGGCACTTCTGAAACCGACA | 60 °C |
| <i>Mcp1</i> | GCCCCACTCACCTGCTGCTACT | CCTGCTGCTGGTGATCCTCTTGT | 60 °C |
| <i>Tnf-α</i> | CCCTCACACTCAGATCATCTTCT | GCTACGACGTGGGCTACAG | 60 °C |
| <i>Pref-1</i> | GACCTGGAGAAAGGCCAGTA | AGGGAGAACCATTGATCACG | 60 °C |
| <i>C/EBP-β</i> | GCA AGA GCC GCG ACA AG | GGC TCG GGC AGC TGC TT | 60 °C |
| <i>Cpt1</i> | TGTCCAAGTATCTGGCAGTCG | CATAGCCGTCATCAGCAACC | 60 °C |
| <i>Nos2</i> | GCCACCAACAATGGCAACA | CGTACCGGATGAGCTGTGAATT | 60 °C |
| <i>Gpx</i> | CAGGAGAATGGCAAGAATGAAG | GAAGGTAAAGAGCGGGTGAG | 60 °C |
| <i>Cat</i> | GCAGATACCTGTGAACTGTC | GTAGAATGTCCGCACCTGAG | 60 °C |
| <i>Sod1</i> | AAGACTGGAAATGCTGGGAG | GGTTTGAGGGTAGCAGATGAG | 60 °C |
| <i>Sod2</i> | TGCTCTAATCAGGACCCATTG | CATTCTCCCAGTTGATTACATTCC | 60 °C |

4.9 Dosagem de adiponectina por ELISA

Aproximadamente 100 mg de TAB subcutâneo e epididimal foram utilizados para extração de proteínas com tampão de extração contendo EDTA 10 mM, Tris 100 mM, Pirofosfato de sódio 10 mM, Fluoreto de sódio 10 mM, Ortovanadato de sódio 10 mM e Triton X-100 1%. A concentração de adiponectina e TNF-alfa foram mensuradas pelo kit

DuoSet ELISA seguindo as instruções do fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; número de catálogo DY1119 and DY410). Os dados foram expressos em pg de citocina normalizados pela concentração de proteína (mg/mL) na amostra. Os experimentos foram executados de acordo com o método já estabelecido e utilizado pelo nosso grupo de pesquisa (SÁ et al., 2016).

4.10 Análises estatísticas

Os dados foram analisados pelo programa Microsoft Excel 2013® e GraphPad Prism 5.0, utilizando-se análise de variância ANOVA de uma via, de duas vias e/ou test-t não pareado, e como pós teste Bonferroni ou Tukey, como indicado nas figuras. Diferenças foram consideradas significativas quando apresentaram $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Protocolo experimental 1

5.1.1 Massa corpórea e consumo alimentar dos animais

Inicialmente, camundongos com 8 semanas de vida, alimentados com uma dieta balanceada receberam gavagem durante 4 semanas com o ácido palmitoleico (grupo 16:1n7) ou água (grupo CO).

Na Figura 1 estão ilustrados o perfil de massa corpórea (Figura 1A) e do consumo alimentar (Figura 1B) dos animais, cujos dados foram mensurados semanalmente. Como pode ser observado, não houve diferenças significativas entre os grupos durante o período de avaliação.

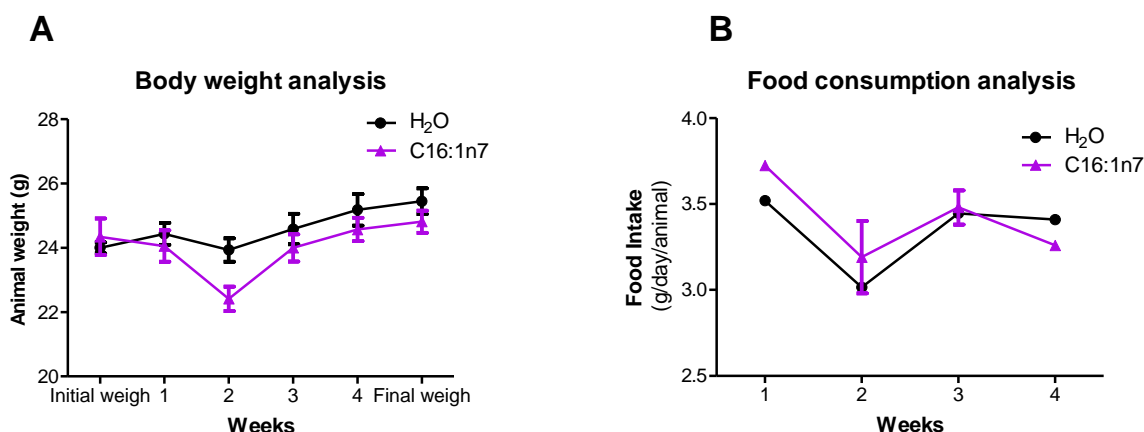


Figura 1. A) Perfil da massa corpórea. B) Perfil do consumo alimentar. Os dados foram coletados semanalmente, a partir do início das gavagens até a eutanásia. Os dados representam média \pm EPM. Grupos controle (H₂O) vs. ácido palmitoleico (16:1n7). Teste ANOVA bifatorial, pós-teste de Bonferroni, 6-7 animais por grupo.

Quando calculamos a diferença entre a massa corpórea inicial e final (delta) dos animais, ou seja, antes e após as 4 semanas de gavagens diárias, observamos uma tendência de diminuição desta nos animais que foram suplementados com o ácido palmitoleico (Figura 2B), embora os animais tenham iniciado o protocolo com o mesmo peso (Figura 2A). Assim, os dados preliminares nos sugeriram que os animais tratados com 16:1n7 tendiam ganhar menos massa corpórea ($p = 0,12$).

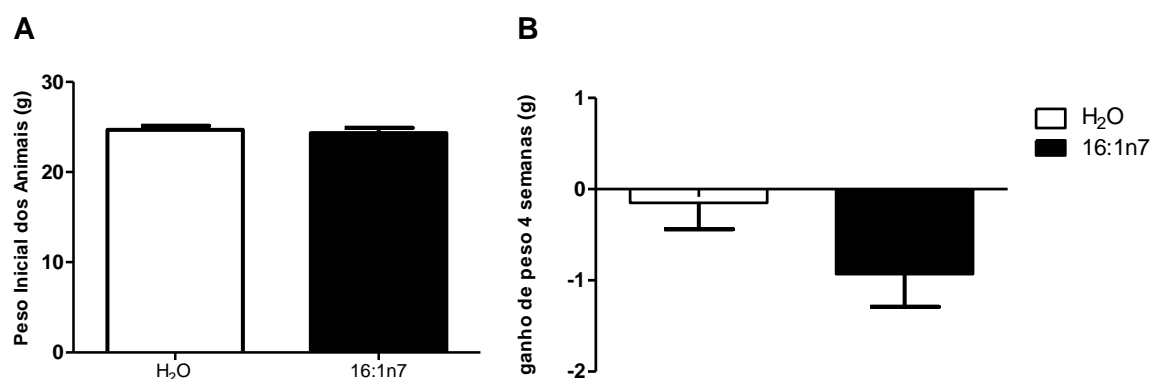


Figura 2. **A)** Massa corpórea inicial. **B)** Diferença entre massa corpórea inicial e final (delta) dos animais que receberam 4 semanas de gavagens diárias com 16:1n7. Os dados representam média \pm EPM. Grupos controle (H₂O) vs. ácido palmitoleico (16:1n7). Teste T não-pareado, n=6-7.

5.1.2 Efeitos da suplementação com o ácido palmitoleico sobre a massa dos tecidos e a adiposidade.

Como mencionado, ao final do protocolo experimental (4 semanas de gavagens diárias), os animais foram submetidos à eutanásia. Foram realizadas as pesagens dos seguintes tecidos: adiposos (subcutâneo inguinal, epididimal, retroperitoneal e marrom), fígado e coração.

Não houve diferença estatística entre os grupos em relação à massa do fígado e coração (Figura 3E e F). Houve, entretanto, de acordo com os dados deste experimento “piloto”, uma tendência de diminuição na massa do tecido adiposo marrom no grupo de animais que foram suplementados com o ácido palmitoleico ($p = 0,057$), porém não nos coxins adiposos do TAB (Figura 3A, B, C, D). Outro achado curioso, foi a massa do tecido adiposo marrom destes animais, que apresentou diminuição em relação ao grupo CO (Figura 3 D, E).

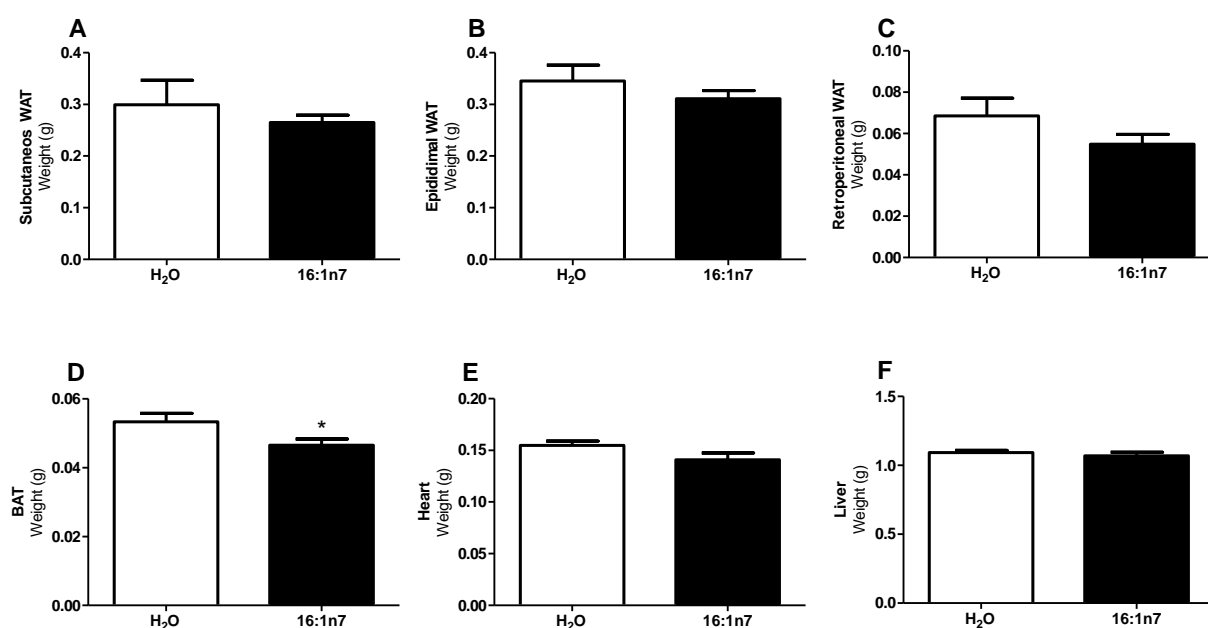


Figura 3. Massa dos tecidos dos animais. **A)** Subcutâneo; **B)** Epididimal; **C)** Retroperitoneal; **D)** Tecido adiposo marrom (TAM); **E)** Coração **F)** Fígado. Os dados representam média \pm EPM. Grupos controle (H₂O) vs. ácido palmítico (16:1n7). Teste T não-pareado, 6-7 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs H₂O.

5.1.3 Análise de expressão gênica

A seguir estão ilustrados os dados obtidos pelas análises de expressão de alguns genes que codificam proteínas relacionadas com função mitocondrial e termogênese no TAB subcutâneo de ambos os grupos de animais (Figura 4).

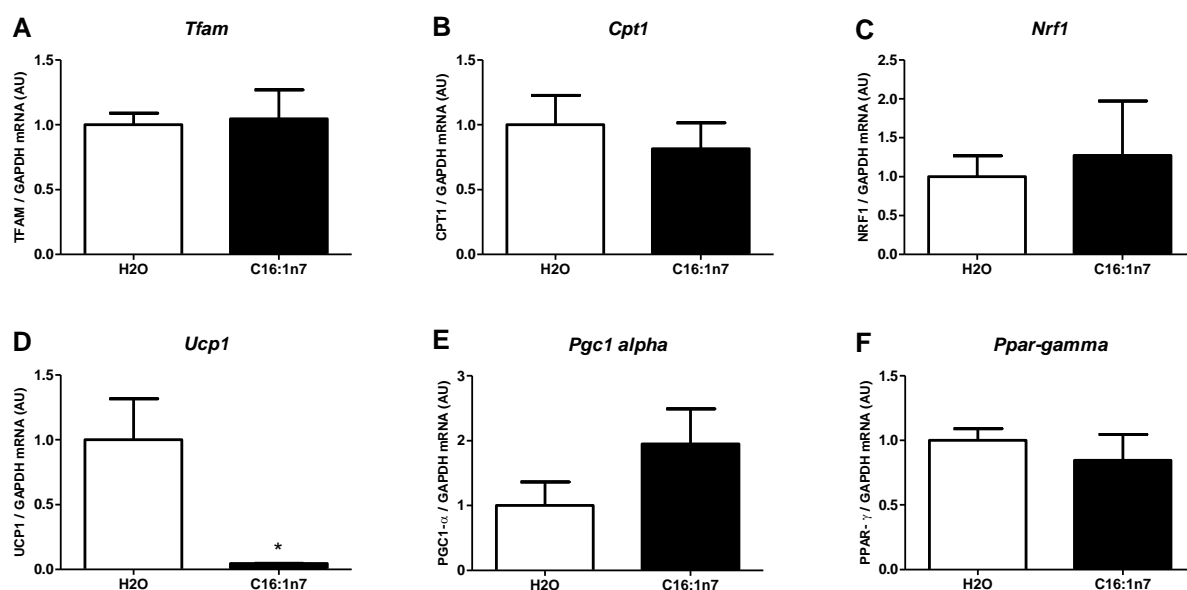


Figura 4. Análise gênica no TAB subcutâneo. **A)** *Tfam*. **B)** *Cpt1*. **C)** *Nrf1*. **D)** *Ucp1*. **E)** *Pgc1 alpha*. **F)** *Ppar gamma*. Os resultados foram corrigidos pela expressão do gene constitutivo (*Gapdh*) e normalizados em relação ao controle (H₂O). Os dados representam média \pm EPM. Grupos controle (H₂O) vs. ácido palmítico (16:1n7). Teste T não-pareado, n=6-7. * $p < 0,05$ vs H₂O.

Aparentemente, a expressão do RNAm dos genes relacionados com função mitocondrial (*Tfam*, *Nrf1*), beta-oxidação (*Cpt1*) e adipogênese (*Ppar-γ*) não foram alterados. Curiosamente, o gene relacionado com a termogênese (*Ucp1*) foi modulado negativamente pelo tratamento com o ácido palmitoleico. Adicionalmente, o gene relacionado com a biogênese mitocondrial (*Pgc-1α*) apresentou uma tendência ($p = 0,21$) de aumento nos animais suplementados. Em suma, os dados obtidos sugerem que uma análise mais minuciosa acerca da expressão destes genes bem como das funções a eles relacionadas fosse realizada. Assim, passamos a empregar os protocolos experimentais descritos a seguir.

5.2 Protocolo experimental 2

5.2.1 *Massa corpórea e consumo alimentar dos animais.*

Para obtenção dos resultados que serão mostrados a diante, o protocolo foi conduzido utilizando-se uma dieta hiperlipídica ou uma dieta controle, que foram oferecidas desde o início do protocolo experimental, que totalizaram 8 semanas. Nas 4 semanas finais, metade dos animais do grupo que receberam dieta HL (grupo obeso) foram suplementados com ácido palmitoleico simultaneamente à dieta HL, como descrito em Materiais e Métodos.

A massa corpórea dos animais e o consumo alimentar foram monitorados semanalmente. Como pode ser observado na Figura abaixo, os animais submetidos à dieta HL reduziram em ~40% a ingestão de alimento e mantiveram-se assim até o final do protocolo experimental. A suplementação com o ácido palmitoleico não modificou este perfil (Figura 5B). Em relação à massa corpórea, a partir da 3ª semana evidenciou-se diferença estatística entre o grupo controle e os grupos de animais obesos (dieta HL e dieta HL + 16:1n7). Esta diferença foi aumentando ao longo das semanas do protocolo experimental, sendo que na última semana de administração da dieta HL, os animais que a receberam apresentaram um aumento de ~25% na massa corpórea em relação à dieta CO. A suplementação com 16:1n7 nas últimas 4 semanas do protocolo não modificou este efeito, já que não houve diferenças significativas entre os grupos Obeso e o Obeso+n7 (Figura 5A).

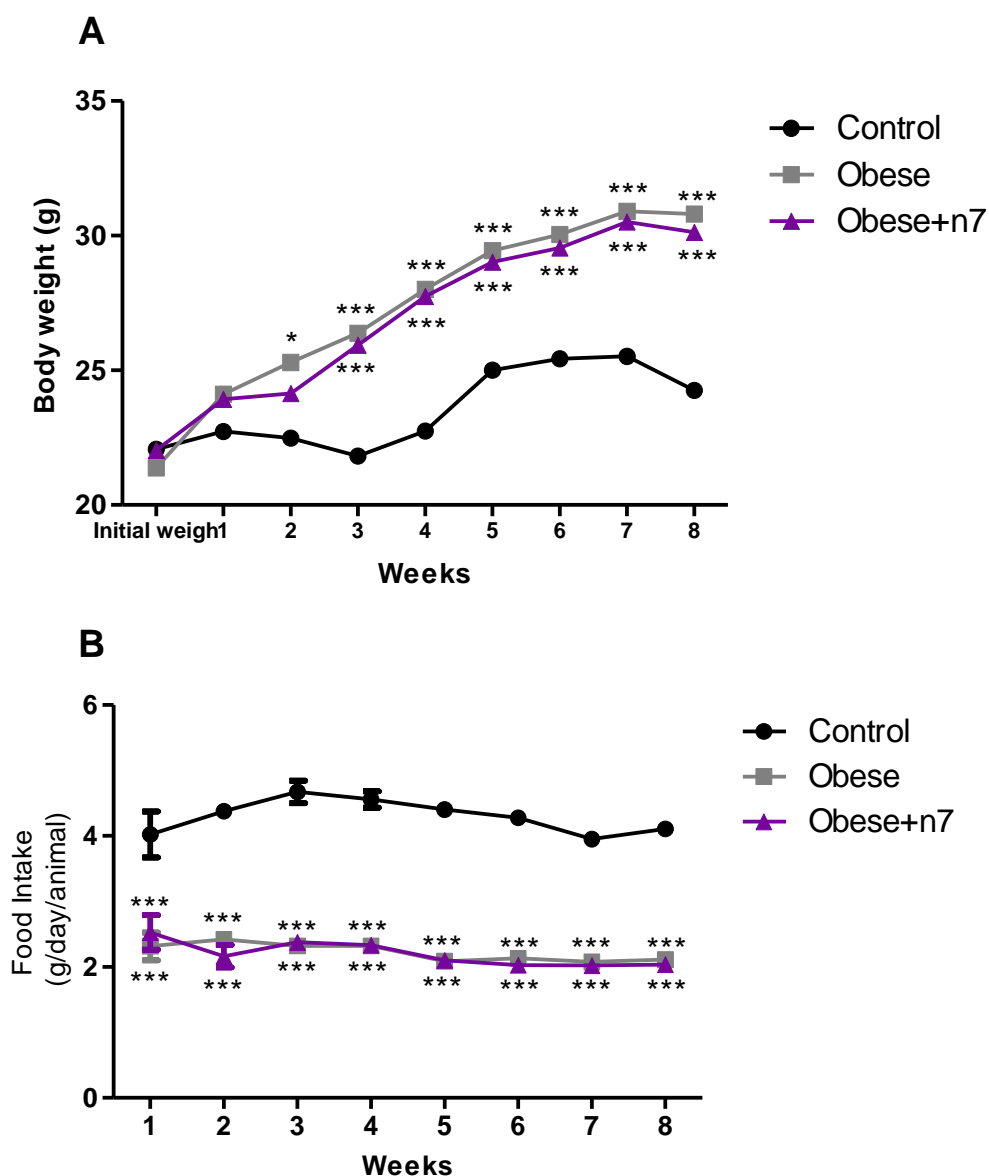


Figura 5. A) Perfil da massa corpórea dos animais. **B)** Perfil de consumo alimentar dos animais. As medidas foram realizadas semanalmente ao longo das 8 semanas. Os dados representam média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs Control, *** $p < 0,001$ vs Control, $n = 12$. Teste ANOVA bifatorial, pós-teste de Bonferroni.

Quando calculamos o ganho de massa corpórea de acordo com o período de protocolo experimental, onde o Período I (primeira à quarta semana de protocolo) foi classificado como o período em que antecede o tratamento com o ácido palmitoleico em que haviam apenas 2 grupos de animais (o que recebeu dieta CO e o que recebeu a dieta HL), verificamos que a dieta HL promoveu aumento significativo (68%) na massa corpórea dos animais (grupo Obeso, Figura 6A).

O período II (quinta à oitava semana) por sua vez, foi criado mais um grupo, o obeso tratado com ácido palmitoleico (Obeso+n7), como descrito em Material e Métodos. De forma interessante,

embora a massa corpórea final dos animais dos grupos Obeso e Obeso+n7 não diferissem, a análise de ganho (delta) de massa mostrou que o grupo Obeso ganhou mais massa corpórea em relação ao grupo controle, contudo, no grupo Obeso+n7 este aumento não foi estatisticamente significativo (Figura 6B). Analisando este ganho de massa apenas entre os grupos Obeso e Obeso+n7 no final do período II por teste *t* de Student, verificamos uma tendência fraca ($p = 0,15$) de menor ganho de massa corpórea no grupo Obeso+n7 (Figura 6C).

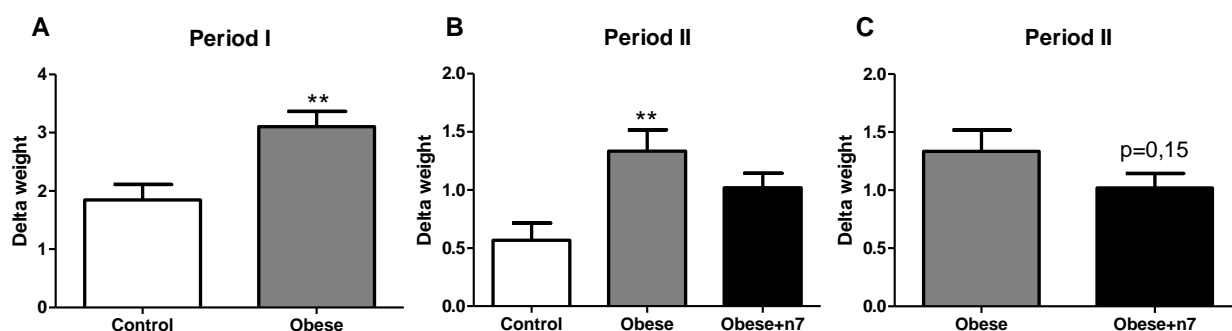


Figura 6. **A)** Análise de ganho de massa corpórea no período I. **B)** Análise de ganho de massa corpórea no período II. **C)** Análise de ganho de massa corpórea no período II entre os grupos que receberam a dieta HL. Os dados representam média \pm EPM. ** $p < 0,01$ vs Control vs Control, $n=12$. Teste *t* não-pareado e ANOVA one-way, pós-teste Tukey.

Analisando a eficiência energética e alimentar destes animais, foi possível observar que a dieta HL aumentou significativamente as eficiências (energética e alimentar) em ambos os períodos do protocolo. O ácido palmitoleico, por sua vez, promoveu uma diminuição desta eficiência, prevenindo parcialmente o efeito promovido pela dieta HL (Figura 7).

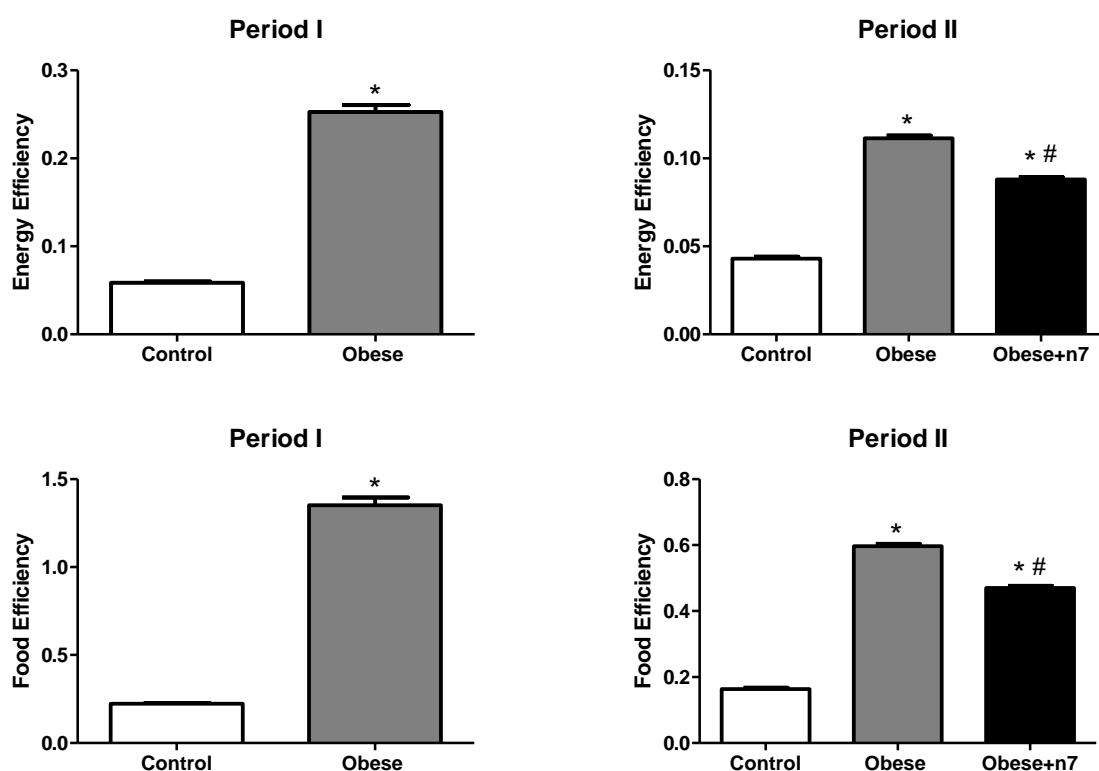


Figura 7. A) Análise de eficiência energética período I. B) Análise de eficiência energética período II. C) Análise de eficiência alimentar no período I. D) Análise de eficiência alimentar período II. Os dados representam média \pm EPM. * $p < 0,0001$ vs Control, # $p < 0,0001$ vs Obese, $n = 10-12$. Teste t não-pareado e ANOVA one-way, pós-teste Tukey.

5.2.2 Efeitos da dieta hiperlipídica e suplementação com o ácido palmitoleico sobre a massa dos tecidos, a adiposidade, a concentração de TG no fígado e a hipertrofia das células adiposas.

Ao final do protocolo experimental, os animais foram submetidos à eutanásia e os tecidos foram retirados, pesados e reservados para as análises propostas. Os gráficos abaixo ilustram a massa de cada tecido retirado dos animais: TAM interscapular, TAB subcutâneo, retroperitoneal e epididimal, fígado e coração.

A massa dos TAB viscerais (epididimal e retroperitoneal) foram significativamente aumentadas com a dieta hiperlipídica (Figura 8B e C), fato não evidenciado no TAB subcutâneo (Figura 8A), ainda que tendo mostrado uma tendência de aumento. A suplementação com o ácido palmitoleico não influenciou esta medida. A massa de tecido adiposo marrom não foi alterada com a dieta (Figura 8D), assim como o coração também não sofreu alterações após realização deste protocolo (Figura 8E).

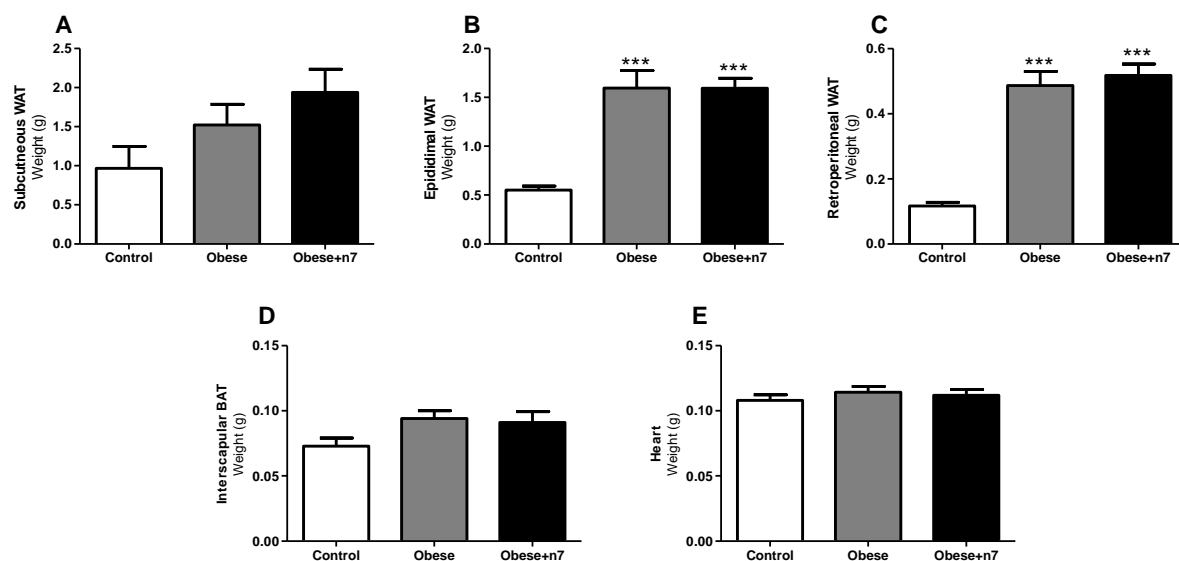


Figura 8. Massa (em gramas) dos tecidos dos animais. **A)** Tecido adiposo marrom. **B)** Tecido adiposo branco subcutâneo. **C)** Tecido adiposo branco epididimal. **D)** Tecido adiposo branco retroperitoneal. **E)** Coração. Os dados representam média \pm EPM. *** $p < 0,001$ Vs Control, $n=12$. Teste ANOVA one-way, pós-teste Tukey.

Abaixo seguem análises do peso do fígado e a concentração de triglicérides no mesmo. O peso total do fígado dos animais não apresentou diferença entre os grupos (Figura 9A), porém, sobre os triglicérides neste órgão, a dieta HL aumentou significativamente (~87%) o conteúdo nos animais obesos, contudo o ácido palmitoleico foi capaz de prevenir este efeito, diminuindo a concentração de triglicérides no fígado (Figura 9B).

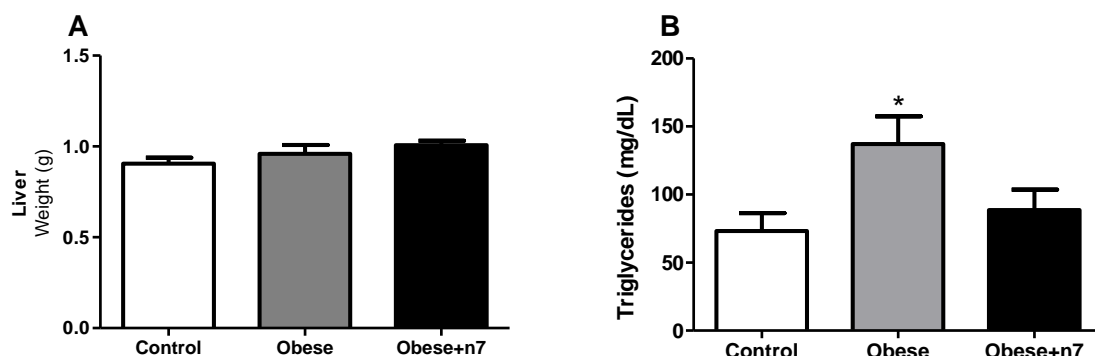


Figura 9. **A)** Massa (em gramas) do fígado dos animais, os dados representam média \pm EPM. **B)** Análise dos triglicérides do fígado, os dados foram expressos em mg/dL. * $p < 0,05$ Vs Control, $n=9-10$. Teste ANOVA one-way, pós-teste Tukey.

Uma vez observado que a dieta hiperlipídica foi efetiva em aumentar a massa corpórea dos animais bem como dos coxins adiposos, foi avaliado então o diâmetro médio das células adiposas (Figura 10). Esses dados nos permitiram investigar o efeito da dieta HL bem como a suplementação com o ácido palmitoleico sobre a hipertrofia dos adipócitos.

Os dados obtidos revelam que a dieta HL foi capaz de influenciar a adiposidade do tecido por aumentar a hipertrofia celular, pois observamos um aumento (~2x) no diâmetro dos adipócitos dos grupos obesos, quando comparados aos animais que consumiram dieta CO em ambos os coxins adiposos avaliados (RP e SUB). Novamente, a suplementação com o ômega-7 não influenciou este parâmetro (Figura 10A, B).

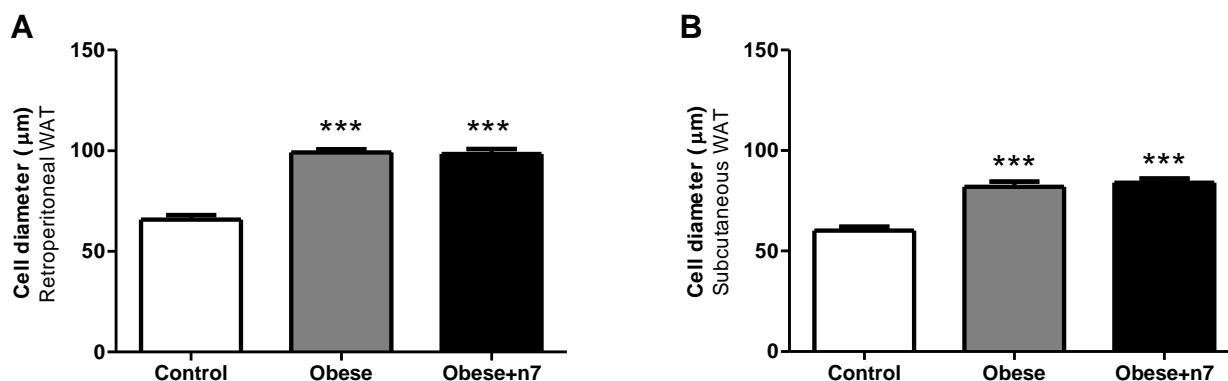


Figura 10. Hipertrofia dos adipócitos. **A)** Diâmetro celular médio dos adipócitos RP e **B)** Diâmetro celular médio dos adipócitos SUB. Os dados representam média \pm EPM. *** $p < 0,001$ vs Control, $n=12$. Teste ANOVA one-way, pós-teste Tukey.

5.2.3 Dosagens plasmáticas

As dosagens plasmáticas foram realizadas nos animais afim de mensurar a taxa de glicose plasmática de jejum, além de triglicerídeos, colesterol total e frações.

Os dados mostraram que a dieta HL aumentou significativamente os níveis de triglicerídeos (28%, Figura 11B), colesterol total (31%, Figura 11C), HDL (34%, Figura 11D), LDL (52%, Figura 11E) e VLDL (33%, Figura 11F). Os níveis de glicose não apresentaram diferença entre os grupos (Figura 11A.)

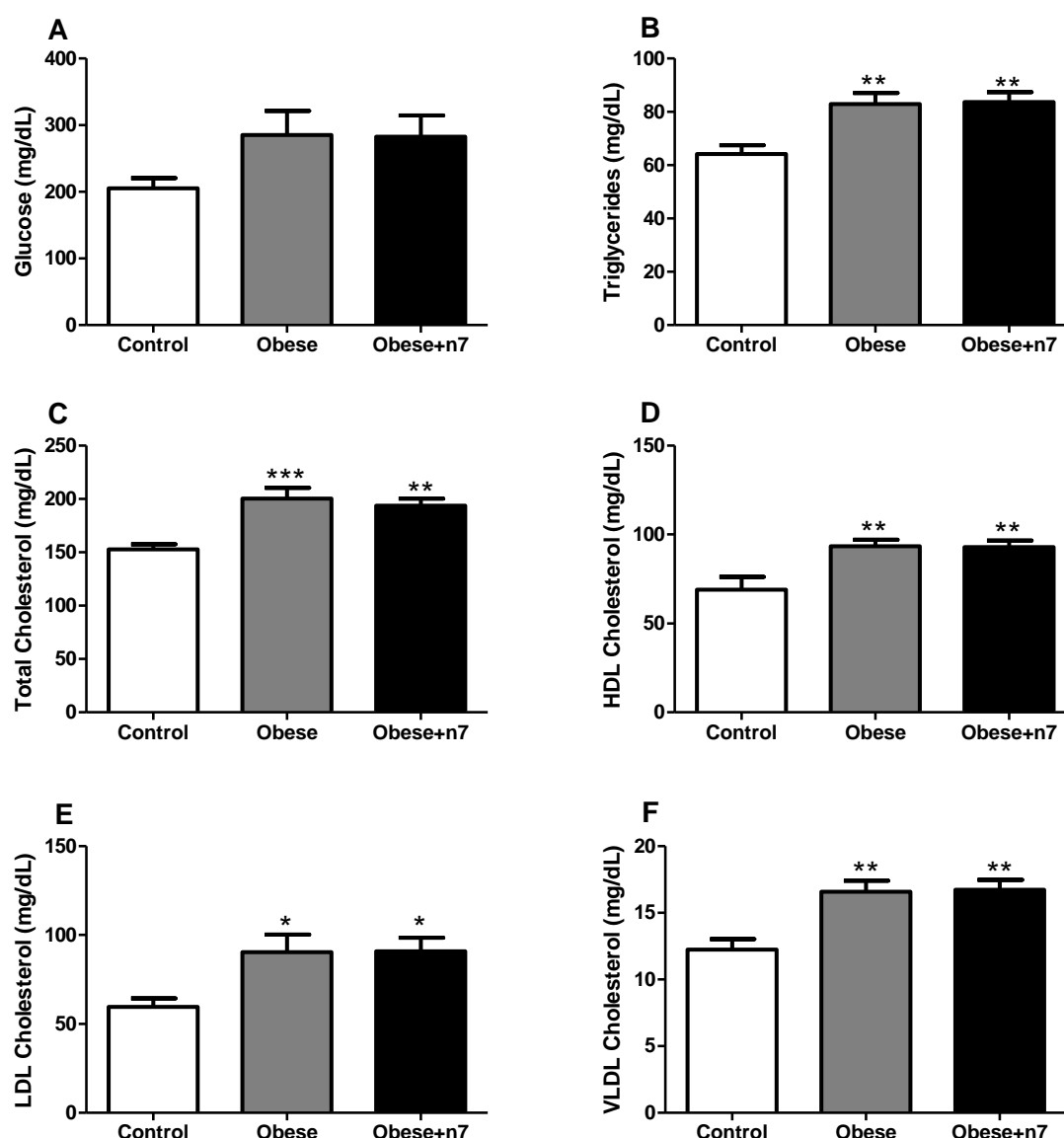


Figura 11. Dosagens plasmáticas de **A)** Glicose, **B)** Triglicerídeos, **C)** Colesterol Total, **D)** HDL, **E)** LDL e **F)** VLDL. Os dados representam média \pm EPM e foram expressos em mg/dL. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 vs Control, n= 11-12. Teste ANOVA one-way, pós-teste Tukey.

5.2.4 Lipólise

Posteriormente, análises metabólicas foram realizadas no TAB retroperitoneal e subcutâneo dos animais, com o objetivo de estudar os efeitos da dieta HL, bem como analisar se o ácido palmitoleico seria capaz de modular estas atividades.

A lipólise, tanto sob condição basal (sem estímulo), quanto estimulada por isoproterenol (agonista beta-adrenérgico), está ilustrada na Figura 8 no TAB retroperitoneal e subcutâneo. Observamos que o grupo que recebeu dieta HL apresentou um aumento significativo da lipólise [basal ($\sim 2,8x$) e estimulada ($\sim 2,3x$)], quando comparado ao grupo

alimentado com dieta CO no tecido RP. A suplementação com o ácido palmitoleico não afetou os efeitos promovidos pela dieta HL (Figura 12A, B).

Em relação ao TAB subcutâneo, não foram observadas diferenças na atividade de lipólise, tanto sob condições basais quanto estimulada com isoproterenol (Figura 12C, D).

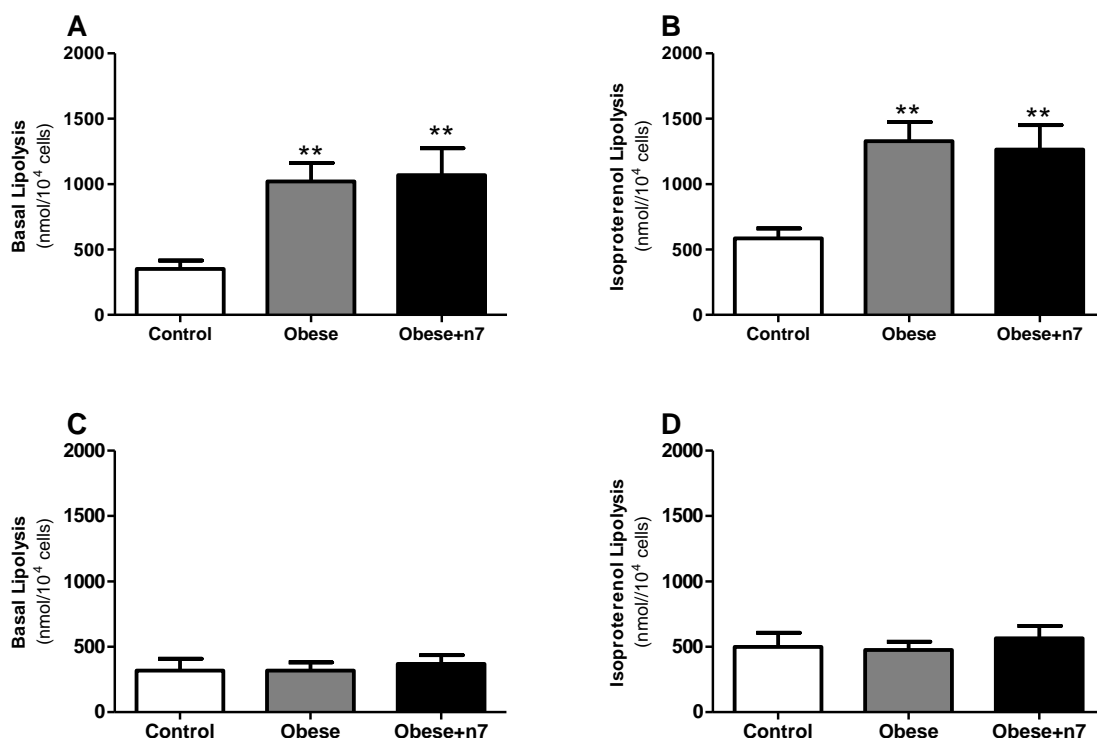


Figura 12. Atividade lipolítica do tecido adiposo branco. **A)** Lipólise basal (TAB retroperitoneal), **B)** Lipólise estimulada por isoproterenol (TAB retroperitoneal), **C)** Lipólise basal (TAB subcutâneo), **D)** Lipólise estimulada por isoproterenol (TAB subcutâneo). Os dados representam média \pm EPM e foram expressos em nmol de glicerol/10⁴ células. **p<0,01 vs Control, n= 6-12. Teste ANOVA one-way, pós-teste Tukey.

5.2.5 Captação de [³H]-2-deoxi D-glicose

A capacidade de captação de glicose, tanto no estado basal (sem estímulo) quanto no estado estimulado (por insulina) foi avaliada neste estudo no tecido adiposo branco subcutâneo. De acordo com nosso resultado referente a estas análises, a estimulação com insulina foi evidenciada pelo aumento (~3x) da captação de glicose pelas células. Entretanto, a dieta HL diminuiu em ~56% a captação maximamente estimulada pela insulina (como já era esperado), sendo que o tratamento com 16:1n7 não reverteu este efeito. Quanto à captação de glicose basal, os grupos não apresentaram diferenças entre si, como ilustra a figura a seguir (13A e B).

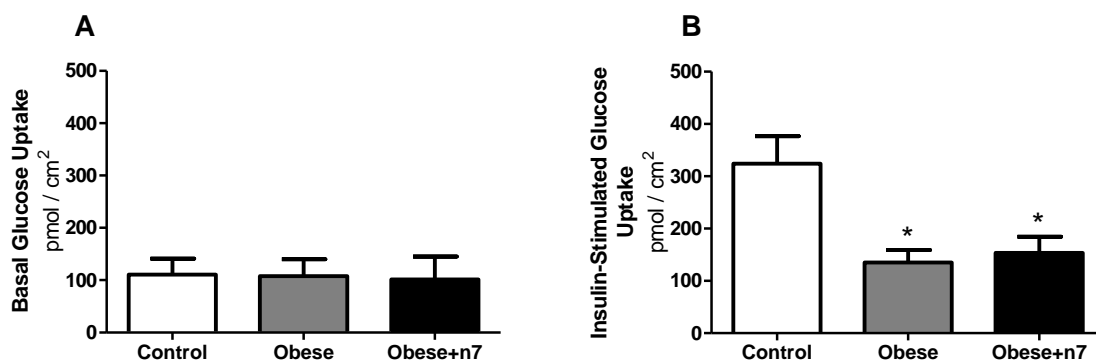


Figura 13. Captação de glicose basal (A) e estimulada por insulina (B) em adipócitos do TAB subcutâneo. Os dados representam média \pm EPM e foram expressos em pmol de [^3H]-2-Deoxi D-glicose em relação a área dos adipócitos (pmol/cm²). n= 5-6. Teste ANOVA one-way, pós-teste Tukey.

5.2.6 Oxidação de [1-C^{14}] palmitato e incorporação em triacilgliceróis (lipogênese)

Estes ensaios metabólicos objetivaram analisar a lipogênese do TAB subcutâneo desses animais, bem como a oxidação de ácidos graxos. Como ilustrado na figura abaixo, a dieta HL aumentou a oxidação de AGs e a lipogênese neste tecido, porém este aumento só foi estatisticamente significativo no grupo Obeso+n7. Os dados mostram que a suplementação com ácido palmitoleico em animais obesos aumentou em 68% a oxidação de ácidos graxos e 77% a lipogênese a partir de palmitato (Figura 14).

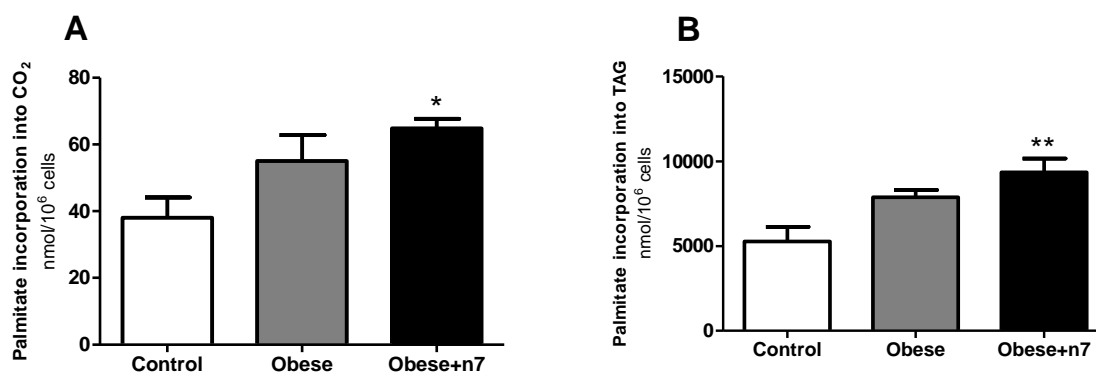


Figura 14. Oxidação de ácidos graxos (A) e lipogênese (B) em adipócitos isolados do tecido adiposo branco subcutâneo. Os dados representam média \pm EPM e foram expressos em nmol de [1-C^{14}] Palmitato por 10⁶ células. *p<0,05, **p<0,01 vs Control, n= 5-6. Teste ANOVA one-way, pós-teste Tukey.

5.2.7 Análises de Expressão Gênica

A seguir, estão ilustrados os dados referentes às análises de expressão de genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo do tecido adiposo: lipólise, lipogênese,

função e beta-oxidação mitocondrial, adipogênese, *browning*, inflamação e função antioxidante.

Os gráficos referentes à expressão de genes analisados no tecido adiposo branco subcutâneo correspondem às figuras 15 a 20. Estes resultados revelam que o ácido palmitoleico está promovendo efeitos sobre a expressão de alguns genes relacionados ao metabolismo de suas células.

Houve aumento da expressão dos genes relacionados à lipólise, que codificam as proteínas/ enzimas ATGL (~4x), HSL (~6x) e perilipina (~5x) nos animais que receberam dieta HL em relação ao grupo controle. Entretanto, o grupo Obeso+n7 não apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle nem em relação ao grupo que somente recebeu a dieta HL (Obeso) em relação a expressão de ATGL e HSL. Assim, o ácido palmitoleico preveniu parcialmente o aumento da expressão de enzimas lipolíticas e no caso da perilipina, este aumento foi menor em relação ao grupo Obeso (~3,8x) (Figura 15).

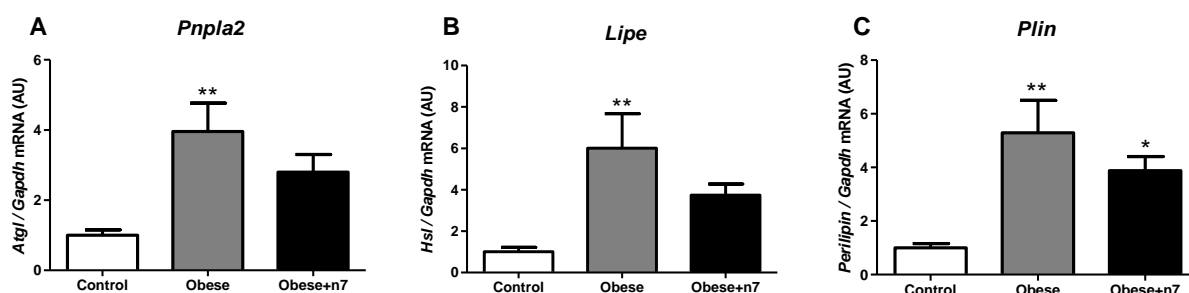


Figura 15. Conteúdo de RNAm de genes relacionados à lipólise em TAB subcutâneo. **A)** *Pnpla2* (*Atgl*), **B)** *Lipe* (*Hsl*) e **C)** *Plin* (*Perilipina*). Os dados representam média \pm EPM e foram expressos em unidades arbitrárias referente aos níveis de RNA mensageiro. ** $p < 0,01$ vs Control, $n = 9-12$. Teste ANOVA one-way, pós-teste Tukey.

A seguir (Figura 16) estão ilustrados os dados referentes à expressão de genes que codificam proteínas relacionadas à lipogênese (captação de AGs e lipogênese *de novo*), a captação de glicose (GLUT4) e adipocinas.

O conteúdo de RNAm da LPL apresentou aumento em sua expressão tanto no grupo Obeso (~4x) quanto no grupo Obeso+n7 (~3x), embora o aumento apresentado pelos animais tratados com ácido palmitoleico tenha sido menor, quando comparado ao grupo não tratado (Figura 16A).

O gene que codifica FABP4, proteína envolvida na ligação e transporte de AG no interior dos adipócitos, apresentou aumento tanto no grupo Obeso (~90%) como no grupo

Obeso+n7 (~2,2x), sendo somente este último resultado diferente estatisticamente quando comparado ao grupo controle (Figura 16B).

A expressão do gene que codifica a lipina, enzima envolvida com uma etapa “chave” de síntese de TAG, aumentou significativamente no grupo Obeso (~2,1x), o que não ocorreu no grupo tratado com 16:1n7, (Figura 16C).

O gene que codifica o complexo enzimático FAS (sintase de ácidos graxos) foi menos expresso tanto no grupo Obeso (~44%) como no grupo Obeso+n7 (~74%), sendo apenas este último diferente estatisticamente do grupo controle (Figura 16D).

Em relação à acetil-CoA carboxilase (ACC1), esta teve sua expressão diminuída no grupo Obeso (~70%) e uma queda ainda mais acentuada no grupo Obeso+n7 (~80%), como pode ser observado na Figura 16E.

A expressão do gene que codifica o transportador de glicose GLUT-4 não apresentou diferença estatística entre os grupos (Figura 16F).

A expressão de Leptina aumentou cerca de 25x no grupo Obeso, já no grupo tratado com ácido palmitoleico esse aumento foi mais atenuado, ~16x (Figura 16G).

A expressão gênica de adiponectina, por sua vez, foi aumentada em ambos os grupos ~2,8x (Figura 16H).

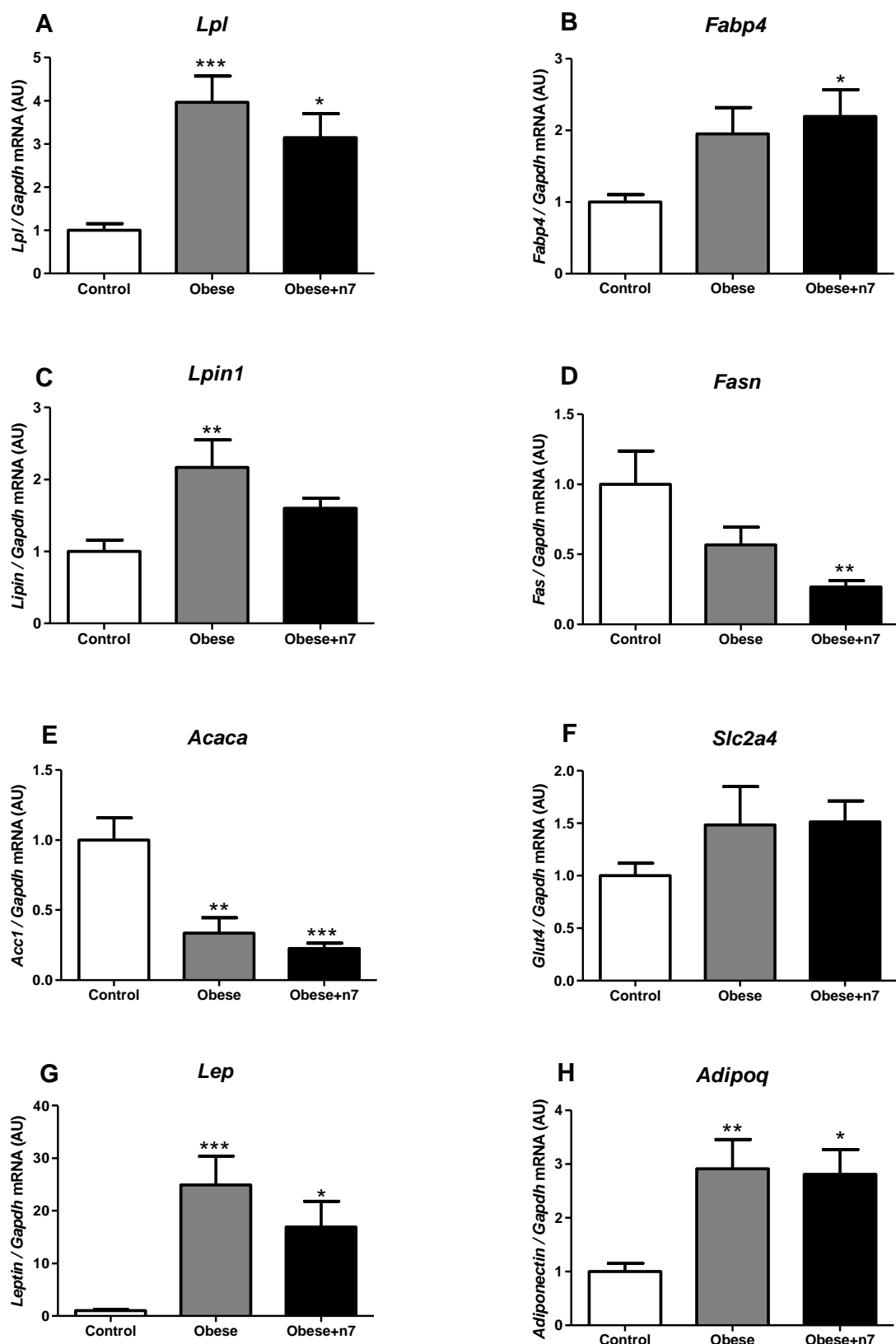


Figura 16. Conteúdo de RNAm de genes relacionados à lipogênese, captação de AGs e adipocinas no TAB subcutâneo. **A)** *Lpl*, **B)** *Fabp4*, **C)** *Lipina*, **D)** *Fas*, **E)** *Acc1*, **F)** *Slc2a4* (*Glut-4*), **G)** *Leptina* e **H)** *Adiponectina*. Os dados representam média \pm EPM e foram expressos em unidades arbitrárias referente aos níveis de RNA mensageiro. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs Control, $n = 9-12$. Teste ANOVA one-way, pós-teste Tukey.

A seguir, os conteúdos de RNAm de genes relacionados à adipogênese são apresentados. O gene que codifica o fator transcricional C/EBP- α foi aumentado cerca de ~3,7x no grupo Obeso, porém, de forma interessante, este gene não foi alterado no grupo Obeso+n7 quando comparado ao grupo Controle (Figura 17A).

O gene que codifica PPAR- γ foi aumentado em ~3,2x em relação ao controle, apresentando diferença significativa. O tratamento com ácido palmitoleico preveniu parcialmente este aumento provocado pela dieta HL (Figura 17B). Já a expressão de Pref-1 não foi modulada de forma significativa, porém uma tendência de aumento foi observada nos grupos Obeso e Obeso tratado com ácido palmitoleico (Figura 17C). A expressão de C/EBP- β foi ~2,4x aumentada no grupo Obeso, sendo este efeito parcialmente prevenido pelo ácido palmitoleico (Figura 17D).

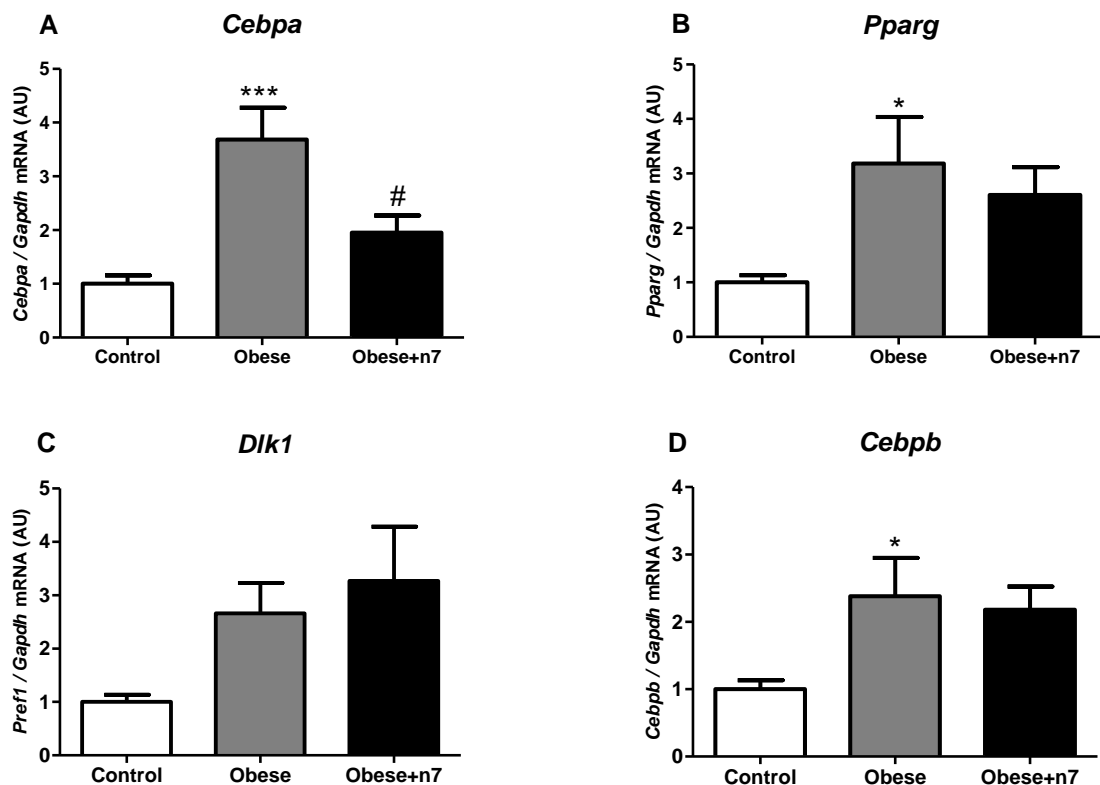


Figura 17. Conteúdo de RNAm de genes relacionados à adipogênese no TAB subcutâneo. **A)** *C/ebp-alfa*, **B)** *Ppar-gama*, **C)** *Pref-1* e **D)** *C/ebp-beta*. Os dados representam média \pm EPM e foram expressos em unidades arbitrárias referente aos níveis de RNA mensageiro. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs Control, # $p < 0,05$ vs Obese, $n = 10-12$. Teste ANOVA one-way, pós-teste Tukey.

A Figura 18 abaixo ilustra os dados referentes ao conteúdo de RNAm de genes relacionados à beta-oxidação, função e biogênese mitocondrial e *browning*.

Um aumento de expressão para os genes que codificam CPT1 (~3,3x), NRF1 (~5,1x) e TFAM (~2,5x) no grupo Obeso foi observado, sendo que o tratamento com ácido palmitoleico preveniu parcialmente estes efeitos (Figura 18A, B, C). Observamos esta mesma tendência para o gene PGC-1 α (~1,6x), porém sem diferença estatística (Figura 18D).

A dieta HL praticamente aboliu a expressão gênica de UCP1 no TAB subcutâneo dos animais (diminuição de 97% da expressão do gene), o que não foi modificado pela suplementação com o ômega-7 (Figura 18E). Já a expressão do gene para PRDM16 aumentou cerca de 4x no grupo Obeso, porém, o tratamento com ácido palmitoleico preveniu parcialmente este efeito (Figura 18F).

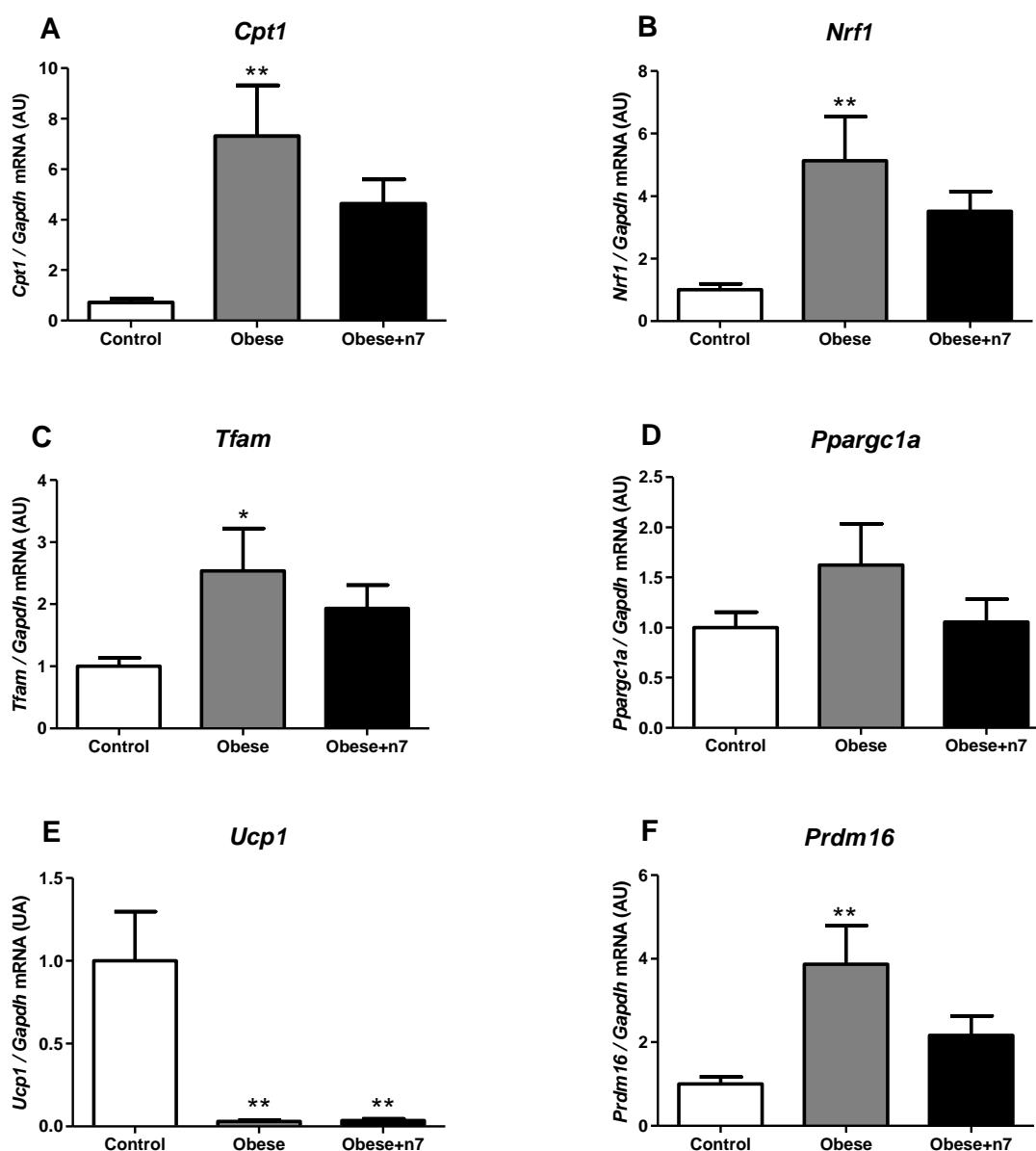


Figura 18. Conteúdo de RNAm de genes relacionados à beta-oxidação, função e biogênese mitocondrial e *browning* em TAB subcutâneo. **A)** *Cpt1*, **B)** *Nrf1*, **C)** *Tfam*, **D)** *Pgc1-alfa*, **E)** *Ucp1* e **F)** *Prdm16*. Os dados representam média \pm EPM e foram expressos em unidades arbitrárias referente aos níveis de RNA mensageiro. *p<0,05, **p<0,01 vs Control, n=9-12. Teste ANOVA one-way, pós-teste Tukey.

Os conteúdos de RNAm expressos por alguns genes relacionados à inflamação são mostrados a seguir.

O gene que codifica MCP-1 teve sua expressão aumentada cerca de 4x no grupo de animais que receberam dieta HL (grupo Obeso), e mais ainda, pela dieta associada ao tratamento (~4,8x no grupo Obeso+n7) (Figura 19A). Já o *Tnf- α* teve sua expressão aumentada nos animais que receberam a dieta HL, com diferença estatística apenas no grupo Obeso+n7, que apresentou aumento de ~3,1x (Figura 19B). A expressão da *Nos2* apresentou

aumento de ~8,6x no grupo Obeso. Já no grupo Obeso+n7 este aumento foi parcialmente prevenido pelo ácido palmitoleico. (Figura 19C).

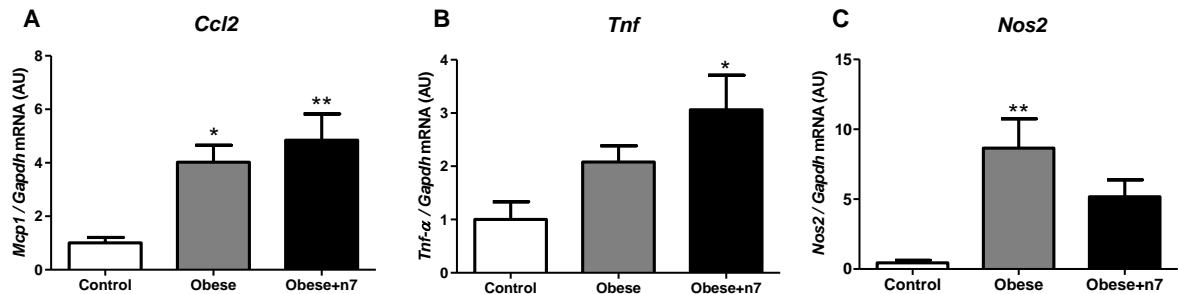


Figura 19. Conteúdo de RNAm de genes relacionados à inflamação no TAB subcutâneo. **A)** *Mcp1*, **B)** *Tnf-alfa* e **C)** *Nos2*. Os dados representam média \pm EPM e foram expressos em unidades arbitrárias referente aos níveis de RNA mensageiro. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs Control, $n = 9-12$. Teste ANOVA one-way, pós-teste Tukey.

Por fim, no TAB subcutâneo, a expressão gênica referente às enzimas antioxidantes: *Glutathione peroxidase* (GPX), *Catalase*, *Superóxido dismutase 1* e *2* (SOD 1 e SOD 2) foi analisada. A expressão de GPX foi modulada positivamente no TAB subcutâneo dos animais obesos, cerca de 2,2x (Figura 20A). A expressão de SOD 1 apresentou um aumento de ~2,2x na sua expressão no grupo Obeso+n7, apresentando um $p = 0,050$ (Figura 20C). Em relação às demais, diferenças significativas não foram observadas entre os grupos (Figuras 20B e D).

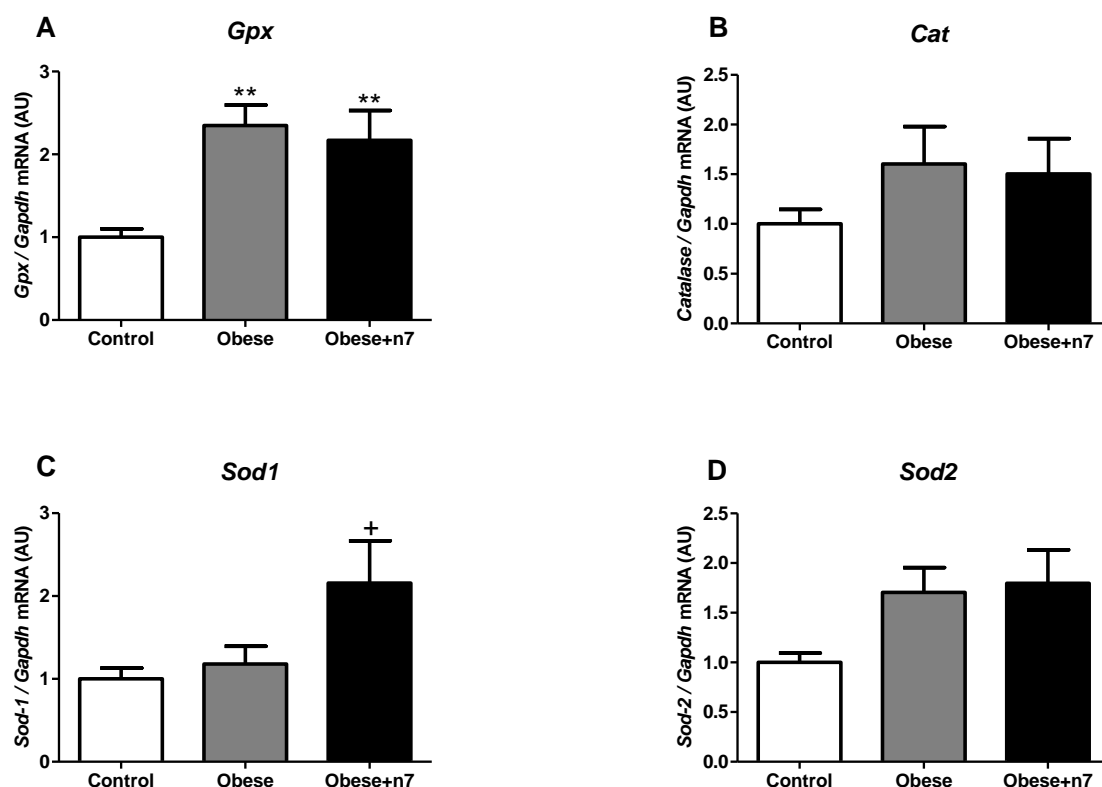


Figura 20. Conteúdo de RNAm de genes relacionados à inflamação no TAB subcutâneo. **A)** GPX, **B)** Catalase, **C)** SOD 1 e **D)** SOD 2. Os dados representam média \pm EPM e foram expressos em unidades arbitrárias referente aos níveis de RNA mensageiro. +p=0,05 vs Control e Obese, **p<0,01 vs Control, n=9-12. Teste ANOVA one-way, pós-teste Tukey.

Análises de expressão gênica também foram realizadas no TAB epididimal, ou seja, um TAB visceral. Foi analisada a expressão gênica de genes relacionados à lipólise, lipólise, lipogênese, adipogênese, função mitocondrial, *browning* e inflamação, bem como função antioxidante.

A seguir, os dados de expressão de genes relacionada a lipólise são mostrados. A expressão de ATGL, não apresentou diferença estatística entre os grupos (Figura 21A), contudo a obesidade promoveu aumento da expressão HSL (~2x) e de Perilipina (~2x), efeito que foi parcialmente prevenido pelo ácido palmitoleico (figuras 21B e 21C).

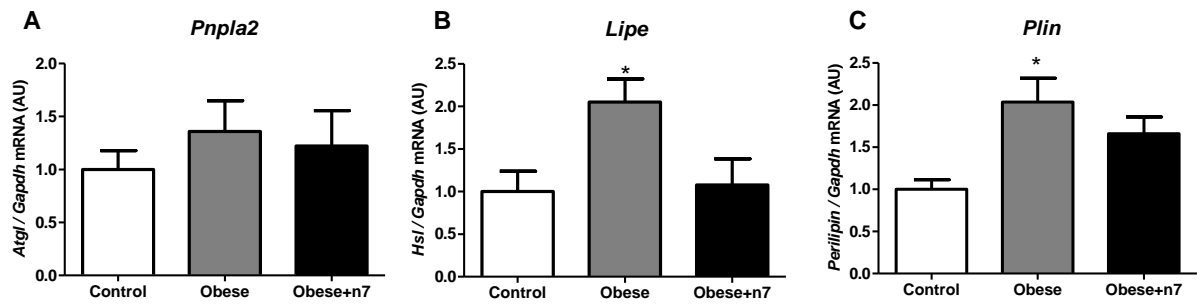


Figura 21. Conteúdo de RNAm de genes relacionados à lipólise no TAB epididimal. **A)** *Pnpla2* (*Atgl*), **B)** *Lipe* (*Hsl*) e **C)** *Plin* (*Perilipina*). Os dados representam média \pm EPM e foram expressos em unidades arbitrárias referente aos níveis de RNA mensageiro. n=9-12. Teste ANOVA one-way, pós-teste Tukey.

Como pode ser visto na figura 22, a dieta hiperlipídica promoveu diminuição da expressão de *Fas* (~60%), *Acc1* (~74%) e aumento da expressão de leptina (~3x) (Figuras 22D, E e G, respectivamente). Já a expressão de adiponectina foi aumentada no grupo tratado com ácido palmitoleico, cerca de 70% (Figura 22H). Os demais genes (*Lpl*, *Fabp4*, *Lipina* e *Glut-4*) não apresentaram diferença estatística (Figuras 22A, B, C e F).

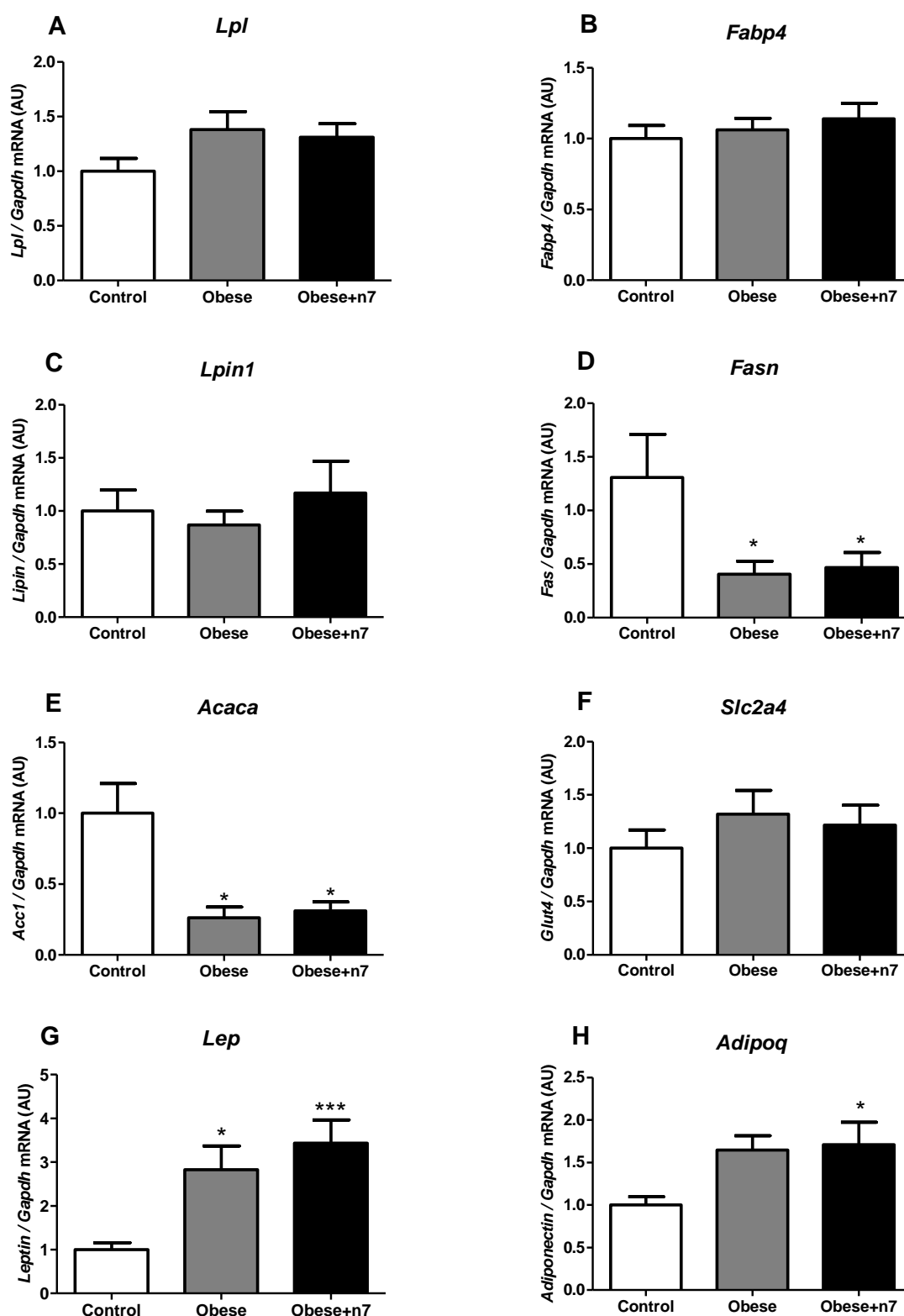


Figura 22. Conteúdo de RNAm de genes relacionados à lipogênese, captação de glicose e adipocinas no TAB epididimal. A) *Lpl*, B) *Fabp4*, C) *Lipina*, D) *Fas*, E) *Acc1*, F) *Slc2a4* (*Glut-4*), G) *Leptina* e H) *Adiponectina*. Os dados representam média \pm EPM e foram expressos em unidades arbitrárias referente aos níveis de RNA mensageiro. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ vs Control, $n=9-12$. Teste ANOVA one-way, pós-teste Tukey.

Genes relacionados à adipogênese foram analisados e os dados não apresentaram diferenças estatisticamente significante entre os grupos (Figura 23A, B, C e D), muito embora houve uma tendência ($p = 0,09$) de aumento na expressão de *Cebp-beta* promovida pelo ácido palmitoleico (Figura 23D). Foi observado uma tendência de aumento da expressão de *Pref1* (~1,9x) promovida pelo ácido palmitoleico, porém não foi considerada diferente estatisticamente ($p = 0,10$).

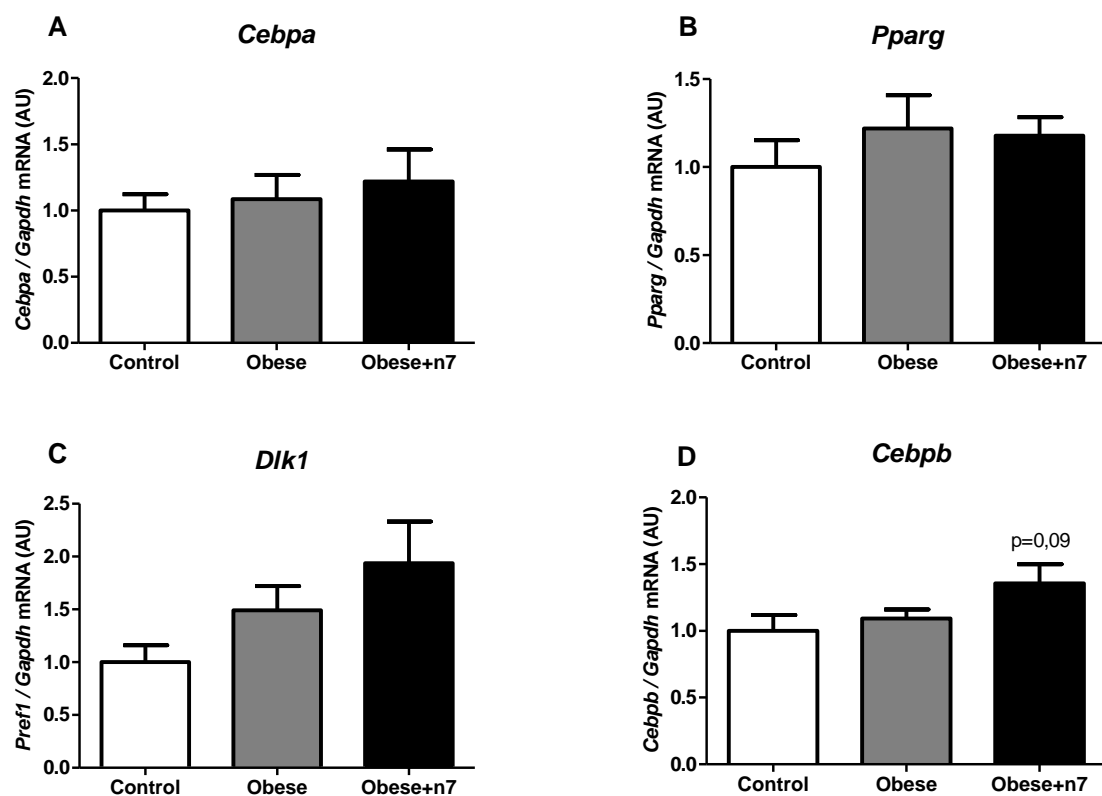


Figura 23. Conteúdo de RNAm de genes relacionados à adipogênese no TAB epididimal. **A)** *Cebp-alfa*, **B)** *Ppar-gama*, **C)** *Pref-1* e **D)** *Cebp-beta*. Os dados representam média \pm EPM e foram expressos em unidades arbitrárias referente aos níveis de RNA mensageiro. $n=9-12$. Teste ANOVA one-way, pós-teste Tukey.

Análises de genes relacionados à oxidação de ácidos graxos (*Cpt1*), função mitocondrial (*Nrf1* e *Tfam*), biogênese mitocondrial (*Pgc1-alfa*) e browning (*Ucp1* e *Prdm16*) foram realizadas no TAB epididimal dos animais. A dieta HL aumentou cerca de 2,3x a expressão gênica de *Cpt1* (Figura 24A), e diminuiu (40%) a expressão de *Pgc1-alfa* (Figura 24D), sendo esta última diferença estatística apenas no grupo Obeso tratado com ácido palmitoleico. Os demais genes analisados (*Nrf1*, *Tfam*, *Ucp1* e *Prdm16*) não apresentaram

diferença entre os grupos (Figuras 23B, C, E e F). Muito embora a expressão de *Ucp1* apresentou tendência fraca ($p = 0,4$) de diminuição no grupo tratado com ácido palmitoleico.

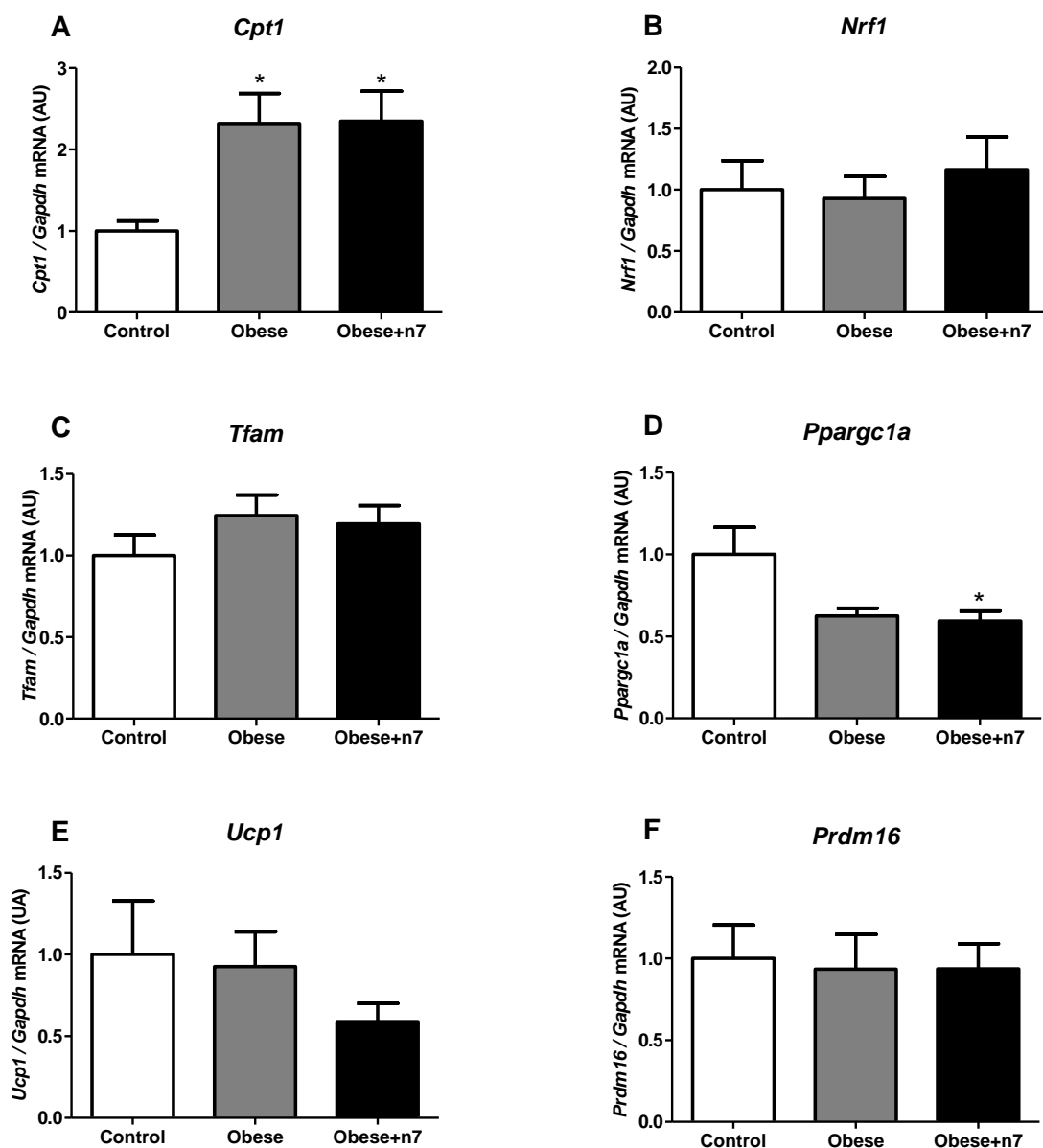


Figura 24. Conteúdo de RNAm de genes relacionados à beta-oxidação, função e biogênese mitocondrial e *browning* no TAB epididimal. **A)** *Cpt1*, **B)** *Nr1*, **C)** *Tfam*, **D)** *Pgc1-alfa*, **E)** *Ucp1* e **F)** *Prdm16*. Os dados representam média \pm EPM e foram expressos em unidades arbitrárias referente aos níveis de RNA mensageiro. * $p < 0,05$, vs Control, $n = 9-12$. Teste ANOVA one-way, pós-teste Tukey.

A seguir, estão representados na Figura 24, os dados de expressão gênica relacionados à inflamação. Os genes analisados foram: *Mcp1*, *Tnf- α* e *Nos2*. A dieta HL aumentou a expressão gênica dos ambos *Mcp1* (~6x) e *Tnf- α* (~3x) e o tratamento com

ácido palmitoleico não modificou este efeito (Figuras 25A e B). Contudo, no caso da expressão de *Nos2*, a dieta HL apresentou tendência ($p = 0,08$) de aumentar sua expressão nos animais obesos, porém o grupo tratado com ácido palmitoleico não apresentou o mesmo efeito (Figura 25C).

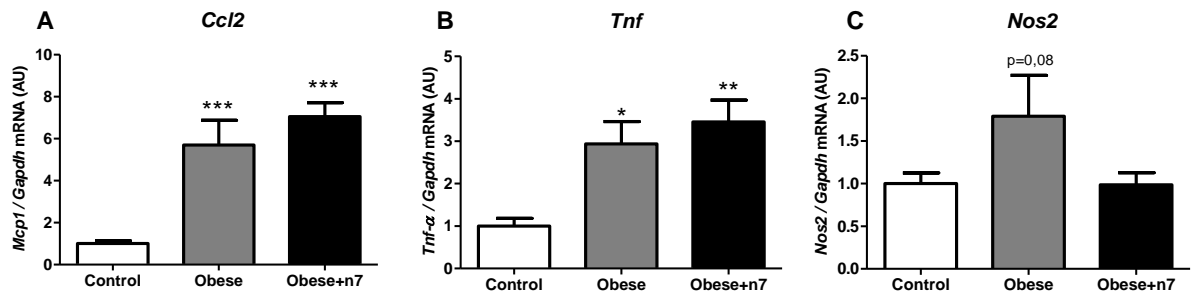


Figura 25. Conteúdo de RNAm de genes relacionados à inflamação no TAB epididimal. **A)** *Mcp1*, **B)** *Tnf-alfa* e **C)** *Nos2*. Os dados representam média \pm EPM e foram expressos em unidades arbitrárias referente aos níveis de RNA mensageiro. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs Control, $n = 9-12$. Teste ANOVA one-way, pós-teste Tukey.

Por fim, no TAB epididimal, análises referentes à expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes foram realizadas e os dados estão representados na figura abaixo. A expressão de GPX, Catalase e SOD1 não apresentou diferença estatística entre os grupos (Figuras 26A, B e C). A dieta HL modulou positivamente a expressão de SOD2 (~2x) e o tratamento com 16:1n7 não modificou este dado (Figura 26D).

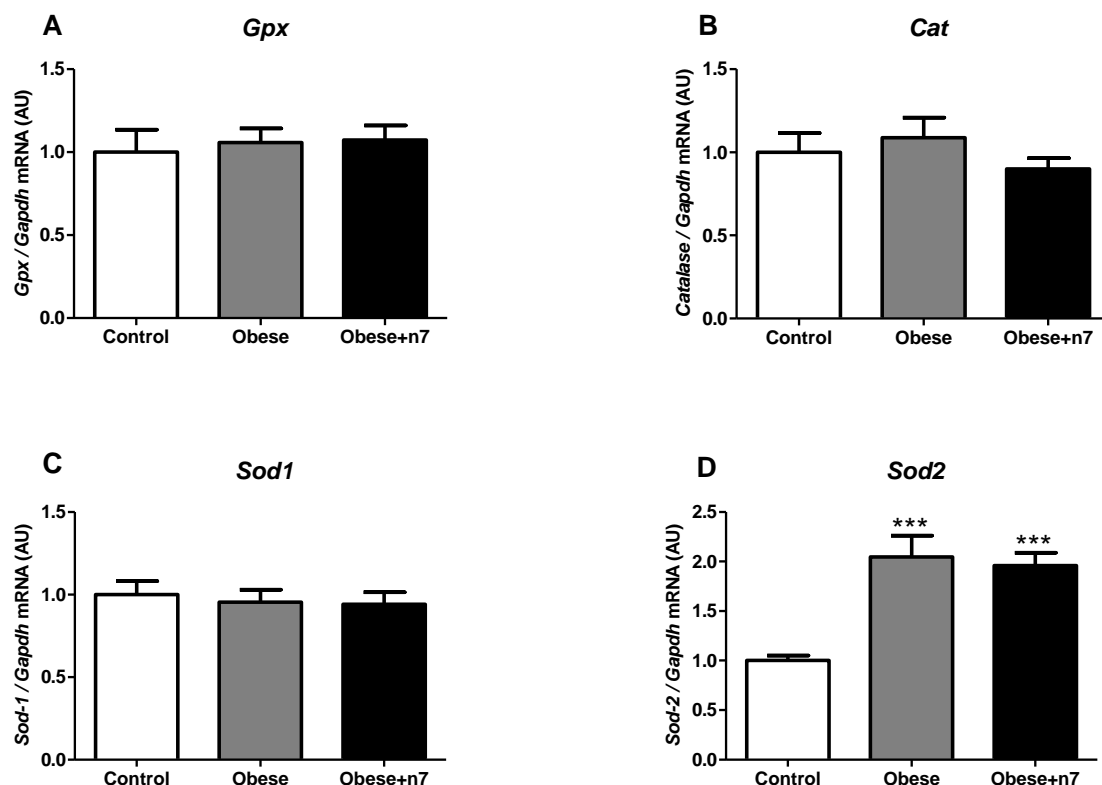


Figura 26. Conteúdo de RNAm de genes relacionados à atividade antioxidante no TAB epididimal. **A)** *Glutathione peroxidase (Gpx)*, **B)** *Catalase (Cat)*, **C)** *Superóxido dismutase 1 (Sod1)* e **D)** *Superóxido dismutase 2 (Sod2)*. Os dados representam média \pm EPM e foram expressos em unidades arbitrárias referente aos níveis de RNA mensageiro. *** $p < 0,001$ vs Control, $n = 9-12$. Teste ANOVA one-way, pós-teste Tukey.

Os gráficos referentes à expressão de genes analisados no TAM (Figura 27) estão ilustrados abaixo. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos quanto à expressão dos genes que codificam C/EBP- α , PPAR- γ , perilipina, CPT1, TFAM, PGC-1 α , UCP1 e PRDM16 no tecido adiposo marrom dos animais (Figura 27A, B, C, F, G, H, I e J). O gene que codifica a enzima chave da via de síntese *de novo* de ácidos graxos (FAS), teve a sua expressão reduzida em ~50% com a dieta HL, e essa redução foi mais acentuada nos animais submetidos à dieta HL e tratados com 16:1n7 [cerca de 70% de diminuição da expressão deste gene (Figura 27D)].

O gene que codifica GLUT-4 (Figura 27E), embora não tenha apresentado diferença estatística, foi reduzido em ~50% nos grupos obesos (tratado ou não com o ácido palmitoleico).

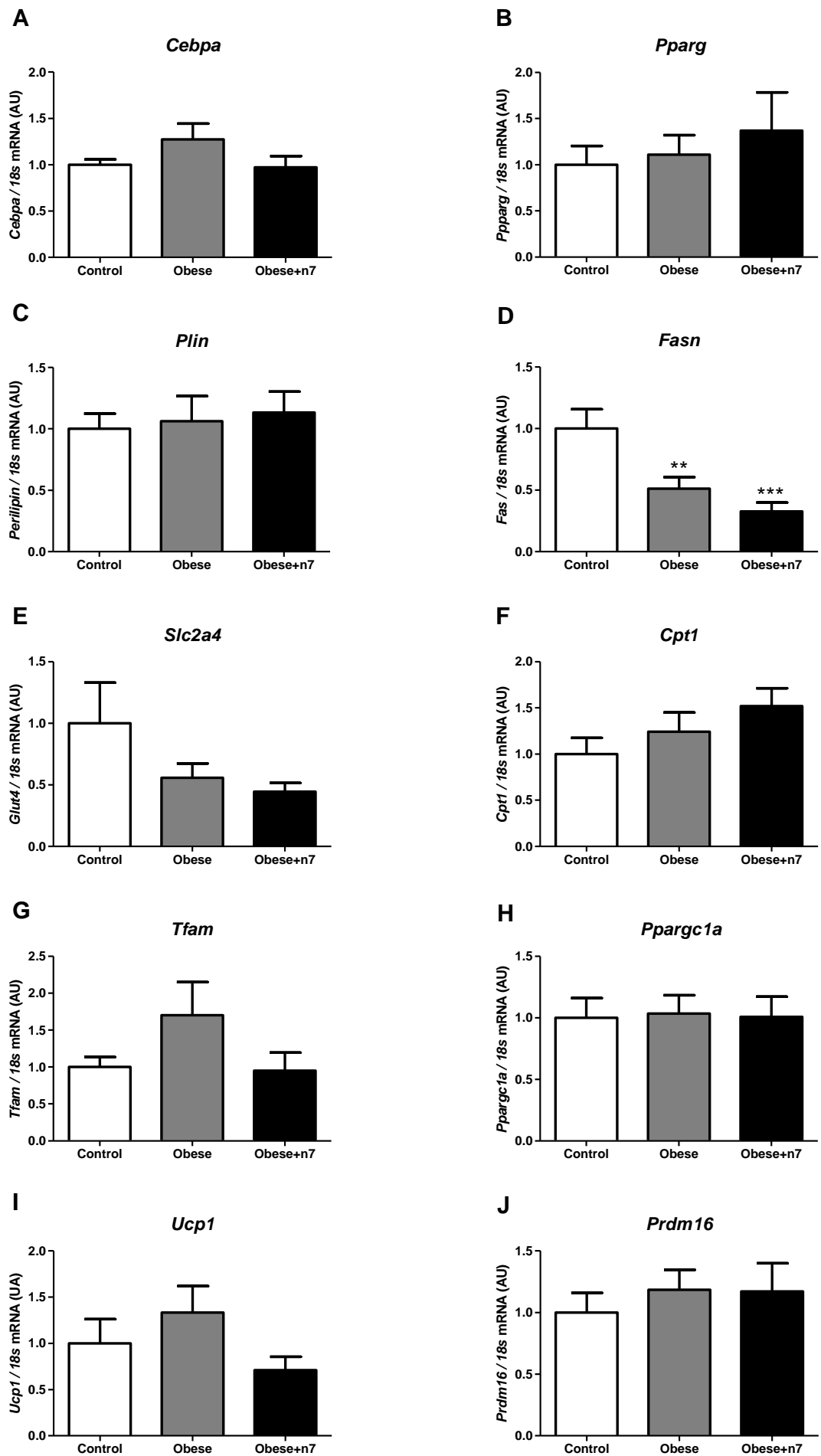


Figura 27. Análise gênica no tecido adiposo marrom. **A)** *C/ebp-alfa* (*Cebpa*), **B)** *Ppar-gama* (*Pparg*), **C)** *Perilipina* (*Plin*), **D)** *Fas* (*Fasn*), **E)** *Glut-4* (*Slc2a4*), **F)** *Cpt1*, **G)** *Tfam*, **H)** *Pgc1-alfa* (*Ppargc1a*), **I)** *Ucp1* e **J)** *Prdm16*. Os dados representam média \pm EPM e foram expressos em unidades arbitrárias referente aos níveis de RNA mensageiro. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs Control, $n = 10-12$. Teste ANOVA one-way, pós-teste Tukey.

5.2.8 Análises de Adiponectina por ELISA

A citocina adiponectina foi mensurada por ELISA nos TAB subcutâneo e epididimal dos animais. No TAB subcutâneo, a dieta HL promoveu aumento da produção desta citocina, efeito que não foi estatisticamente significativo no grupo que recebeu o ácido palmitoleico (Figura 28A). Já no TAB epididimal, não houve diferença entre os grupos (Figura 28B).

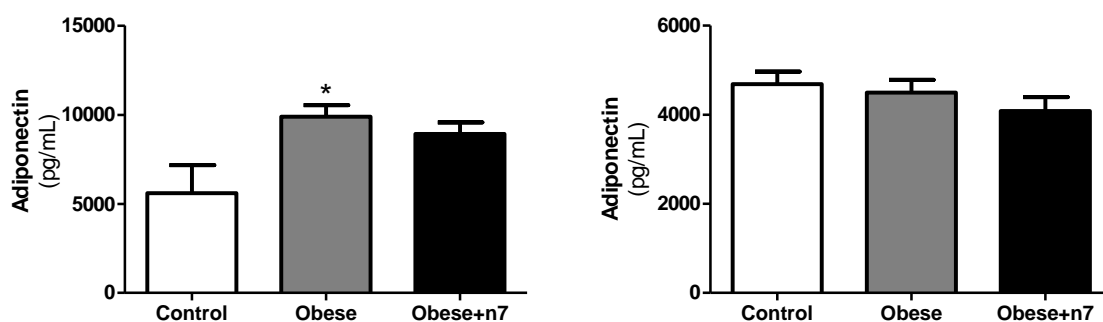


Figura 28. Análise de adiponectina no tecido adiposo branco subcutâneo (**A**) e epididimal (**B**) por ELISA. Os dados representam média \pm EPM e foram expressos em pg/mL de adiponectina normalizados pela concentração de proteínas da respectiva amostra. * $p < 0,05$, vs Control, $n = 10-12$. Teste ANOVA one-way, pós-teste Tukey.

5.3 Protocolo experimental 3

5.3.1 Análise de expressão gênica após indução de browning em adipócitos 3T3-L1

Os dados referentes à expressão de genes envolvidos no processo de *browning*, biogênese e função mitocondrial em adipócitos 3T3-L1 estão ilustrados na Figura 29.

A expressão de *Ucp1* (principal marcador de *browning*) foi aumentado em 2,2x pela presença do ácido palmitoleico, sendo este aumento estatisticamente significativo em relação aos demais grupos (Figura 29A). Neste mesmo sentido, observamos um aumento na expressão de *Tfam*, significativo também apenas nos adipócitos que receberam o tratamento com 16:1n7 (Figura 29D). Por outro lado, a expressão de *Cpt1* (marcador de função mitocondrial), mostrou redução pelo tratamento (Figura 29C). Já a expressão de *Pgc1-alfa* (marcador de biogênese mitocondrial) não foi modulada pelos tratamentos (Figura 29B).

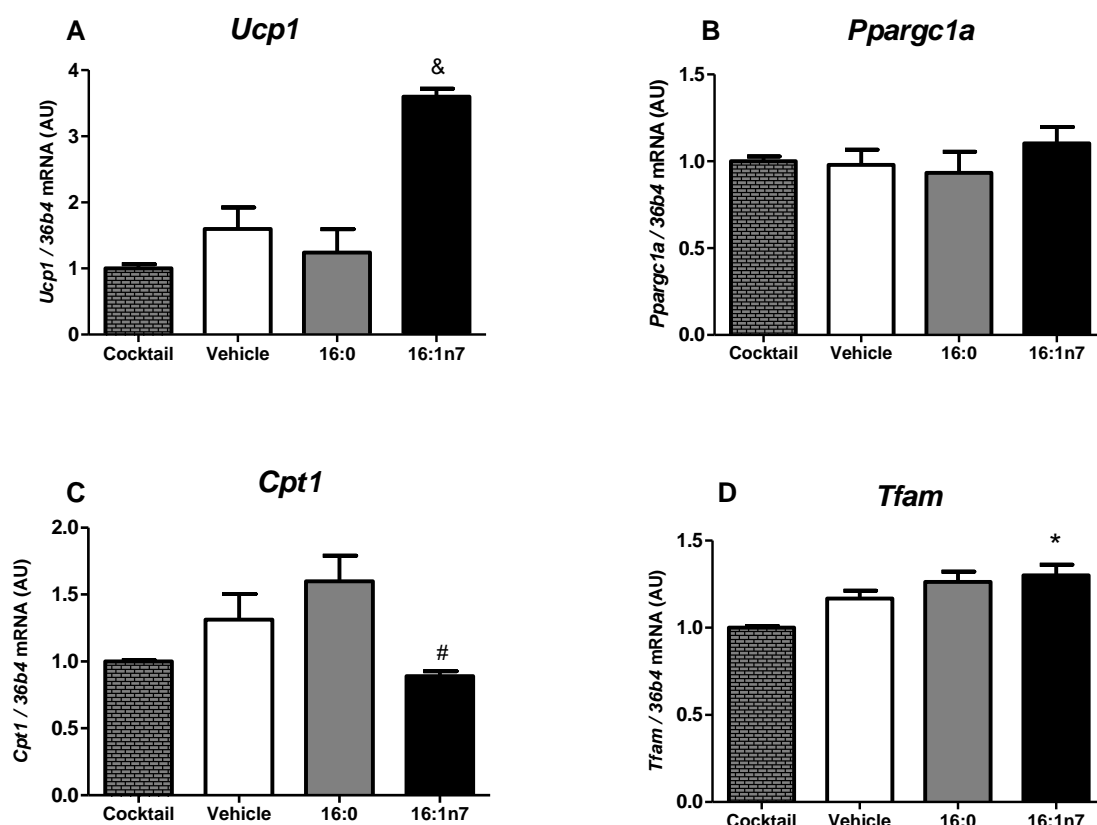


Figura 29. Análise gênica em células 3T3-L1 de A) *Ucp1*, B) *Pgc1-alfa*, C) *Cpt1* e D) *Tfam*. Os resultados foram corrigidos pela expressão do gene constitutivo (*36B4*) e normalizados em relação ao controle (coquetel). Os dados representam média \pm EPM e foram expressos em unidades arbitrárias referente aos níveis de RNA mensageiro. * $p < 0,05$ vs grupo Cocktail, # $p < 0,05$ vs grupo 16:1n7, & $p < 0,001$ vs todos os grupos, $n = 2-5$. Teste ANOVA one-way, pós teste Tukey.

6. DISCUSSÃO

Mostramos anteriormente que o ácido palmitoleico aumenta a atividade lipolítica, lipogênica, consumo de oxigênio, oxidação de AGs e o conteúdo de ATP em linhagem de adipócitos 3T3-L1 (CRUZ et al., 2018). Além disso, mostramos que a massa mitocondrial destes adipócitos se apresenta menor sob tratamento com 16:1n7, porém com consumo de oxigênio aumentado, o que nos levou a inferir que as mitocôndrias presentes nestes adipócitos (mesmo que em menor número) apresentem um aumento de função. Assim, foi sugerido que o ácido palmitoleico aumentaria a taxa metabólica basal dos adipócitos. Para testar esta hipótese *in vivo*, muitos experimentos relacionados à função mitocondrial, metabólica (lipogênica e lipolítica), endócrina e ao *browning* do TAB destes animais são necessários sendo que alguns deles foram investigados aqui.

No presente trabalho, foi verificado que o ácido palmitoleico promove efeitos metabólicos e gênicos no tecido adiposo de animais submetidos à obesidade induzida por dieta HL, bem como em células 3T3-L1 sob estímulo de *browning*.

Observamos que os animais do protocolo experimental 1, apresentaram uma tendência de diminuição de peso corporal e no tamanho do tecido adiposo marrom, dados que precisam ser compreendidos. Uma hipótese, é que o tecido adiposo destes animais esteja metabolicamente mais ativo, uma hipótese reforçada pelos nossos estudos anteriores (CRUZ, et al., 2018). Entretanto, olhando apenas para a expressão do RNAm dos genes relacionados com função mitocondrial, beta-oxidação e adipogênese, não evidenciamos alterações. Curiosamente, o gene relacionado com a termogênese (*Ucp1*) foi modulado negativamente pelo tratamento com o ácido palmitoleico. Se mecanismos compensatórios pós-traducionais estão envolvidos, carece de investigação. Por outro lado, o gene relacionado com aumento de biogênese mitocondrial (PGC-1 α) apresentou uma tendência de aumento de expressão nos animais suplementados com o AG.

Assim, com o objetivo de desafiar a homeostase metabólica e energética dos animais e no intuito de visualizar resultados mais evidentes e/ou buscar possíveis efeitos de reversão/tratamento com o ácido palmitoleico, nós decidimos investigar as ações da suplementação com este AG em animais com obesidade induzida por dieta HL e realizamos o protocolo experimental 2.

O desafio imposto aos animais pela dieta HL gerou um desajuste na homeostase metabólica e energética com repercussão drástica no aumento da massa corpórea e no perfil plasmático lipídico (triglicerídeos, colesterol total e colesterol-LDL), que não foi revertida

pela suplementação por 4 semanas com o ácido palmitoleico como esperávamos, embora uma forte tendência em prevenir o ganho de massa corpórea tenha surgido. Reforçando este último dado, o ácido palmitoleico preveniu parcialmente o aumento da eficiência alimentar e energética dos animais, dando mais consistência à tendência de prevenir o ganho de peso de peso causado pela dieta HL. Adicionalmente, foi verificado um aumento acentuado na massa dos coxins adiposos brancos dos animais com obesidade induzida por dieta e o tratamento com ácido palmitoleico também não impediu ou atenuou este resultado. Este resultado também foi verificado em animais tratados com ácido palmitoleico em um modelo de esteatose hepática (SOUZA et al., 2014). Isso pode se dever ao fato de que o ácido palmitoleico, por ser um nutriente, não possua uma grande capacidade para mudanças rápidas no fenótipo do animal, mas sim efeitos brandos/sutis que trazem importantes repercussões à longo prazo.

A dieta HL promoveu aumento do conteúdo de triglicérides no fígado dos animais, sendo que o ácido palmitoleico foi capaz de prevenir este efeito. O peso do fígado não apresentou diferença entre os grupos. Yang e colaboradores (2011), mostraram que a suplementação com ácido palmitoleico promoveu diminuição do acúmulo de triglicérides no fígado em animais diabéticos geneticamente modificados. Também foi mostrado em camundongos *knockout* (FABP^{-/-}) que o ácido palmitoleico é uma lipocina produzida e liberada pelo tecido adiposo, envolvida na melhora da esteatose hepática nestes animais (CAO et al., 2008). O trabalho de Souza e colaboradores (2014) mostrou que 15 dias de tratamento com ácido palmitoleico (tratados com o AG a partir de 10^a semana) em camundongos que receberam 12 semanas de dieta HL foi capaz de diminuir o conteúdo da *enzima aspartato transaminase* no soro, indicando redução de dano hepático, contudo não diminuiu o conteúdo de triglicérides do fígado, como observamos neste protocolo, após 8 semanas de dieta rica em lipídios e 30 dias de tratamento com ácido palmitoleico. Estes dados reforçam a hipótese de que o ácido palmitoleico é um candidato na prevenção de esteatose hepática causada por dieta hiperlipídica.

Quando analisamos o tamanho dos adipócitos (diâmetro celular médio) retirados do TAB visceral e subcutâneo, foi observado uma hipertrofia destas células em ambos os depósitos adiposos. O aumento do diâmetro celular na condição de obesidade (bem como uma correlação positiva com obesidade patológica) já é bem estabelecido na literatura (SÁ et al., 2016, MASI et al., 2017; GONÇALVES et al., 2017). Entretanto, o ácido palmitoleico não exerceu ação no sentido de atenuar a hipertrofia dos adipócitos analisados.

Assim, no presente modelo experimental, associando obesidade induzida por dieta HL e tratamento com ácido palmitoleico por um período de 4 semanas, não evidenciamos mudanças significativas promovidas pelo ácido palmitoleico sobre o perfil plasmático lipídico, a massa corpórea, a ingestão alimentar e o diâmetro dos adipócitos. Porém, de acordo com trabalhos nossos (BOLSONI-LOPES et al, 2013; 2014; CRUZ et al., 2018) e de outros (CAO et al., 2008; TALBOT, WHEELER-JONES e CLEASBY, 2014; YANG, MIYAHARA e HATANAKA, 2011), e de acordo com resultados prévios obtidos pelo nosso grupo de pesquisa quanto aos efeitos deste ácido graxo em adipócitos 3T3-L1 e em adipócitos epididimais de animais eutróficos, acreditamos que as ações do 16:1n7 (durante o curto período de tempo em que o suplementamos) sejam sutis, e portanto, muitas vezes sobrepostos pela obesidade, o que dificultaria a visualização de alguns efeitos ou talvez seus efeitos ainda não repercutiram no “fenótipo do animal”, tais como o perfil plasmático lipídico, a massa corpórea e algumas das atividades metabólicas que foram aqui investigados. Por conta disso, optamos também em verificar o que está ocorrendo à nível de expressão gênica nestas células, pois se alguma mudança está começando, poderia estar ocorrendo também termos gênicos.

De forma interessante, os resultados sobre a oxidação de AGs em CO₂ e sobre a lipogênese a partir de palmitato no TAB subcutâneo mostraram que o ácido palmitoleico (nos animais obesos) foi capaz de modular significativamente esta atividade. O grupo Obeso+n7 apresentou aumento nos dois parâmetros avaliados. Foi demonstrado anteriormente que este AG aumenta a lipogênese e a oxidação de palmitato em adipócitos 3T3-L1 (CRUZ et al., 2018), além da lipólise, a captação e a oxidação de glicose (BOLSONI-LOPES et al., 2013, 2014; CRUZ et al., 2018). No presente estudo o modelo experimental associa a condição de obesidade, diferentemente das situações dos trabalhos ora citados. De acordo com nossos dados, o ácido palmitoleico parece promover um aumento persistente, pois não são sobrepostos pela obesidade, na lipogênese (incorporação de AGs em TAG) e na oxidação de AG em células adiposas. Corroborando estes dados, o gene que codifica a *lipase de lipoproteínas* (LPL), uma enzima que hidroliza moléculas de TAG encontradas em lipoproteínas (quilomicrons e VLDLs) apresentou um aumento acentuado de sua expressão no grupo de animais com obesidade induzida por dieta HL. Houve também um aumento da expressão, porém menos acentuado, no grupo com obesidade que recebeu o tratamento com ácido palmitoleico. A expressão de *Lipina*, que codifica a enzima envolvida da esterificação de AGs para produção de TAG na gota lipídica, foi aumentada significativamente nos animais obesos, porém este efeito foi parcialmente prevenido pelo ácido palmitoleico. Por outro lado, o ácido palmitoleico promoveu aumento significativo da expressão de *Fabp4*, que está

envolvido no transporte de ácidos graxos no citosol. Uma hipótese para este efeito é que o 16:1n7 promova uma maior captação de AGs neste tecido, que está sendo oferecido em altas concentrações pela dieta e precisa ser estocado como lipídeo neutro nos adipócitos.

É sabido que a atividade de lipogênese *de novo* (ou síntese *de novo* de AG) aumenta quando há oferta hipercalórica (glicose) na dieta (UYEDA; YAMASHITA; KAWAGUCHI, 2002; STOECKMAN; TOWLE, 2002; DELZENNE et al., 2001; KERSTEN, 2001), ocasionando um aumento de ácido palmitoleico na circulação, sendo este AG considerado um marcador de lipogênese *de novo* (CAO et al., 2008). Foi descrito também (DUARTE et al., 2014; SÁ et al., 2016; DELGADO et al., 2009), que a lipogênese *de novo* diminui em resposta a uma dieta HL. Nossos resultados corroboram a literatura, já que a expressão gênica de *Fas* e *Acc1* foi diminuída no grupo Obeso, porém mais ainda no grupo Obeso+n7. Este resultado também corrobora nossos achados anteriores, mostrando que o ácido palmitoleico promove diminuição da lipogênese *de novo* (BOLSONI-LOPES et al., 2014). Apesar de uma menor lipogênese *de novo*, os animais com obesidade induzida pela dieta HL apresentaram um grande aumento na síntese de triacilgliceróis.

A captação de glicose foi avaliada no TAB subcutâneo dos animais, tanto no estado basal como no estimulado por insulina. Não obtivemos diferenças estatísticas entre os grupos no estado basal, porém a dieta HL reduziu a captação de glicose estimulada pela insulina em ambos os grupos de animais (tratados ou não com o ácido palmitoleico). A expressão do transportador de glicose *Glut4* foi avaliada e não mostrou nenhuma modulação em nosso modelo. Dados na literatura mostram que o 16:1n7 aumenta a captação de glicose em músculo (CAO et al., 2008) e nós demonstramos anteriormente também no tecido adiposo epididimal (BOLSONI-LOPES et al., 2014) de camundongos eutróficos e em linhagem 3T3-L1, porém, no modelo de obesidade aqui empregado, não evidenciamos este aumento no TAB subcutâneo. Foi evidenciado que 15 dias de tratamento com ácido palmitoleico (a partir da 10ª semana) em camundongos C57Bl6 submetidos a dieta HL por 12 semanas promoveu uma menor tolerância a glicose e uma maior sensibilidade a insulina (SOUZA et al., 2014). Novamente, acreditamos que a grande mudança na massa corpórea e na ingestão alimentar dos animais desencadeada pela dieta HL parece ter sobrepujado os efeitos que possam ocorrer pela suplementação com o ácido palmitoleico. Assim, optamos por não estudar este parâmetro no TAB epididimal neste modelo experimental de obesidade.

De acordo com os resultados de lipólise, a dieta HL promoveu aumento consistente na atividade lipolítica (basal e sob estímulo máximo) no TAB RP (visceral), sendo que no TAB SUB essa atividade não foi modulada. O ácido palmitoleico não modificou esta resposta

nos animais obesos, ainda que descrevemos em estudo prévio um aumento desta atividade em TAB epididimal de animais eutróficos e em linhagem de adipócitos 3T3-L1 tratados com o 16:1n7 (BOLSONI-LOPES et al., 2013). A lipólise no TAB visceral foi mais acentuada do que no TAB subcutâneo, esta diferença já é bem descrita e ocorre por este último se tratar de um tecido pouco lipolítico (SÁ et al., 2016; IBRAHIM, 2010; ARNER et al., 1990).

Em relação à expressão de genes relacionados à lipólise, a dieta HL ocasionou um aumento na expressão de *Atgl*, *Hsl* e *Perilipina* no TAB visceral e também no subcutâneo, mesmo não repercutindo em diferenças no ensaio metabólico (atividade lipolítica) neste último tecido. O ácido palmitoleico preveniu parcialmente os efeitos da dieta HL em aumentar a expressão de *Atgl*, *Hsl* e *Perilipina* em ambos os tecidos.

Foi descrito que dependendo do estado de ativação da perilipina, esta pode atuar protegendo e delimitando a gota lipídica ou facilitando o processo hidrólise dos TAG (BRASAEMLE et al., 2007; SEGENES et al., 2003). Entretanto, foi demonstrado recentemente que a obesidade cursa com um aumento na expressão gênica de perilipina (GALLARDO-MONTEJANO et al., 2016), o que também corrobora nossos achados. Han et al. (2017), também mostraram que dieta HL por 24 semanas aumentou a expressão proteica de ATGL, perilipina, PKA e AMPc no TAB visceral, porém diminui a expressão p-HSL em camundongos C57Bl/6. Sabe-se que as enzimas lipolíticas (ATGL e HSL) participam na atividade catabólica do tecido adiposo, e a inibição de ação ou expressão das mesmas induz acúmulo de TAG nos adipócitos (SCHWEIGER et al., 2012). Entretanto, está bem estabelecido que a obesidade cursa com um aumento no tamanho dos adipócitos, fazendo com que as células hipertrofiadas se tornem mais lipolíticas, liberando AGLs circulantes, levando o fígado à uma superprodução de lipoproteínas de baixa densidade (LDL-colesterol) (FERRANTI; MOZAFFARIAN, 2008; ADIELS et al., 2008). Adicionalmente, níveis elevados de AGL levam a um aumento da deposição destes lípideos em órgãos periféricos, tais como o músculo e o fígado que, na ausência de um aumento significativo nas taxas de oxidação destes AGs como ocorre na obesidade (HOROWITZ; KLEIN, 2000), culmina na lipotoxicidade e na gênese da resistência à insulina e/ou apoptose (VIRTUE & VIDAL-PUIG, 2010). No presente trabalho, mostramos que o tratamento com ácido palmitoleico foi benéfico em prevenir os efeitos desencadeados pela da dieta HL de aumento da expressão de *Atgl*, *Hsl* e *Perilipina* nos coxins adiposos brancos dos animais.

A expressão de alguns genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo e função do TAM foi avaliada. Apenas a expressão do gene que codifica a FAS foi modulada (reduzida) nos grupos de animais obesos, sendo que no grupo Obeso+n7, a diminuição da

expressão deste gene foi ainda mais acentuada que no grupo obeso não suplementado. Foi descrito que o ácido palmitoleico promove diminuição da síntese *de novo* de AGs no TAB (BOLSONI-LOPES et al., 2014). Provavelmente este efeito possa ocorrer também no TAM, já que uma diminuição na expressão da FAS corrobora uma queda desta atividade metabólica.

Na análise de expressão gênica no TAB subcutâneo dos animais obtivemos diversos resultados de modulação promovidos pela dieta HL e, em muitos casos, efeitos promovidos pela suplementação com ácido palmitoleico.

A dieta HL promoveu aumento substancial na expressão dos genes codificadores de CPT1, NRF1, TFAM e PRDM16. Estes genes estão envolvidos na oxidação de AGs, função e biogênese mitocondrial (CHAN, 2006; VENTURA-CLAPIER, GARNIER e VEKSLER, 2008; BI et al., 2014). O tratamento com ácido palmitoleico preveniu parcialmente estes efeitos no TAB subcutâneo. Uma hipótese para estes achados que ocorreram com a obesidade, seria uma possível adaptação metabólica mitocondrial, na tentativa de “lidar” com a oferta de AGs provenientes da dieta, aumentando a atividade mitocondrial no tecido nessa fase inicial da condição de obesidade. Indivíduos obesos apresentam aumento da expressão proteica de SOD2, PPAR-alfa e PGC1-beta quando comparados a indivíduos eutróficos (SILVEIRA et al., 2019). O grupo Obeso+n7 aparenta não necessitar de adaptação na mesma proporção, ainda que recebendo a mesma dieta HL. Warfel e colaboradores (2017) não detectou diferenças na expressão gênica de *Cpt1* no TAB subcutâneo de camundongos C57Bl/6, porém, seu modelo experimental de obesidade foi de 40 semanas. Camundongos ob/ob apresentam diminuição da expressão gênica de *Nrf1*, *Tfam* e *Pgc-1 α* (VALERIO et al., 2006), corroborando a falha da função e biogênese mitocondrial com o avanço da obesidade. O PRDM16 induz a expressão de *Pgc-1 α* e *Ucp1*, estando intimamente relacionado com o controle da determinação de *browning* (SEALE et al., 2011). Além do efeito sobre o *browning*, o PRDM16 aumenta a biogênese mitocondrial, o desacoplamento, bem como o consumo de oxigênio no tecido adiposo (BOURNAT; BROWN, 2010). As mitocôndrias têm um papel crucial no controle do balanço energético, produção de ATP, gasto de energia, suporte energético durante a adipogênese, dentre outras funções. Excesso de substratos energéticos leva a disfunção mitocondrial, prejudicando o metabolismo da glicose e lipídios. Os adipócitos ajudam a manter um balanço apropriado entre armazenamento e gasto de energia, e este balanço requer uma função mitocondrial normal, bem como adequada para dar suporte às funções metabólicas do tecido (GAO et al., 2010; BOURNAT; BROWN, 2010; DUCLUZEAU et al., 2011).

A dieta HL reduziu severamente a expressão gênica de UCP1 no TAB. Nossos dados mostraram que a obesidade praticamente abole a expressão deste gene no TAB subcutâneo. É descrito que a diminuição da expressão de *Ucp1* induz obesidade (FELDMANN et al., 2009). Nossos resultados indicam que o tecido (neste caso, o TAB subcutâneo) pode estar com a atividade termogênica diminuída. Neste caso, a suplementação com ácido palmitoleico não foi efetivo em reverter, ainda que parcial, tamanha queda. Se mecanismo regulatório pós-traducional está ocorrendo, faz-se necessário realizar análise de expressão proteica de UCP1 para elucidar estes efeitos.

Baseado nestes resultados, verificamos que a hipótese inicial acerca da ação do ácido palmitoleico na indução de *browning* no TAB subcutâneo necessita de um modelo melhor delineado (exposição ao frio, uso de thiazolidinedione - TZDs) para ser testada. No presente trabalho, não foi possível a confirmação da mesma em modelo animal.

Entretanto, empregando a linhagem celular de pré-adipócitos 3T3-L1 e a adição de coquetel adipogênico e indutor de *browning*, foi possível estudar os efeitos do ácido palmitoleico *in vitro* sobre este parâmetro. De forma interessante, evidenciamos neste modelo que o ácido palmitoleico induziu aumento da expressão gênica de *Ucp1*, possivelmente indicando fenótipo de *browning*, ou seja, células com “*brown fat-like phenotype*” (HU et al., 2015; WU et al., 2012). A expressão de UCP1 foi cerca de 2 vezes aumentada em relação ao veículo e ao grupo tratado com ácido palmítico. O aumento da expressão de *Ucp1*, todavia, não foi acompanhada pelo aumento de *Pgc1a*, gene intimamente relacionado com biogênese mitocondrial, mas foi acompanhado por um aumento de *Tfam*. Lone e Yun (2016) demonstraram que o limoneno induz fenótipo parecido com a gordura marrom em adipócitos brancos 3T3-L1. Os autores fizeram tratamento utilizando 3 doses: 1µM, 25µM e 50 µM. As 3 doses promoveram aumento da expressão proteica de PGC1-α, contudo, somente a maior dose promoveu aumento proteico de UCP1. Além disso, neste estudo, a dose de 50µM aumentou a expressão gênica de UCP1. Foi mostrado que a hiperoxia melhora o metabolismo dos carboidratos por indução de *browning* em adipócitos brancos de ratos obesos e diabéticos tipo 2; houve aumento da expressão proteica de UCP1 sem aumento de PGC1-α (NOROUZIRAD et al., 2019), tal qual observado no presente estudo por expressão gênica. O tecido adiposo é considerado um dos tecidos mais afetados por conta da disfunção mitocondrial, além dos músculos esquelético e cardíaco e o fígado (KUSMINSKI; SCHERER, 2012). Assim, o aumento de *Ucp1* promovida pelo ácido palmitoleico sugere um fenótipo, pelo menos parcial de *browning*, e poderia representar um possível mecanismo pelo

qual o ácido palmitoleico aumenta a atividade mitocondrial e o metabolismo basal de adipócitos 3T3-L1, como sugerido anteriormente (CRUZ et al., 2018).

Em relação à expressão dos fatores transcricionais adipogênicos, é sabido que o fator transcricional C/EBP β é um dos primeiros fatores de transcrição a se expressar após exposição das células ao coquetel de diferenciação e seu declínio de expressão é gradual ocorrendo por volta do 8º dia pós-diferenciação. C/EBP β é necessário para ativar a expressão de PPAR γ , o qual é transcricionalmente induzido durante o dia 2 sendo máxima por volta dos dias 3-4, e de C/EBP α , que chega a expressão máxima nos dias 4-5 da diferenciação. Uma vez ativados os reguladores dominantes da adipogênese, C/EBP α e PPAR γ , estes se auto-regulam positivamente para manterem-se expressos, apesar da redução da expressão de C/EBP- β , e induzem a transcrição de genes alvos do adipócito, incluindo enzimas e proteínas envolvidas na geração e manutenção do seu fenótipo, os marcadores terminais da diferenciação (FARMER, 2006; NTAMBI; YOUNG-CHEUL, 2000; YEH et al., 1995). Observamos em nosso estudo, que somente o grupo Obeso apresentou expressão aumentada de *Cebpb*, *Cebpa* e *Pparg* no TAB subcutâneo, já que o grupo Obeso+n7 não apresentou diferenças em relação ao controle. Além disso, a expressão dos genes que respondem ao C/EBP α e PPAR γ , que codificam ATGL, HSL e perilipina (envolvidos na lipólise), LPL e lipina (envolvidos na captação de AG e lipogênese), leptina e NOS2 (envolvida na inflamação em animais obesos), CPT1, NRF1, TFAM e PRDM16 (envolvidos na biogênese mitocondrial) foi parcialmente revertida no TAB subcutâneo do grupo de animais que recebeu o tratamento com ácido palmitoleico. Assim, o ácido palmitoleico parece abrandar os efeitos da dieta HL. De acordo com nossos resultados, parece que os animais que receberam a dieta HL e a gavagem com o AG não têm a mesma necessidade de adaptação ao desafio imposto pela obesidade induzida pela dieta, quanto os animais que receberam apenas a dieta HL e gavagem com água.

A dieta HL também promoveu aumento da expressão gênica de *Adipoq* nos TAB subcutâneo e epididimal. Quando analisamos a expressão da proteína por ELISA, no TAB subcutâneo a dieta HL aumentou esta citocina, mas não de forma significativa no grupo tratado com ácido palmitoleico. No TAB epididimal não houve diferença entre os grupos. Embora os dados sejam intrigantes, é sabido que a adiponectina é um marcador importante de adipogênese *de novo* (SCHRIJVER et al., 2019; LEE et al., 2019), o que corroboram nossos dados de aumento de expressão dos fatores transcricionais adipogênicos nos animais obesos verificados em nosso estudo.

A expressão dos genes que codificam as citocinas inflamatórias MCP1 e TNF- α foi aumentada tanto no grupo Obeso (não estatístico para TNF- α no TAB subcutâneo) como no grupo Obeso+n7. De forma interessante, a expressão destes genes foi mais acentuada no grupo Obeso+n7. Estes dados demonstram que pode estar acontecendo algum mecanismo regulatório imunológico no grupo de animais que estão sob o tratamento com ácido palmitoleico. Para a confirmação destes resultados, experimentos de expressão proteica e ensaios imunológicos devem ser realizados. 15 dias de tratamento com ácido palmitoleico com 12 semanas de dieta HL promoveu redução na expressão gênica e proteica de TNF- α no fígado de camundongos C57Bl6 (SOUZA et al., 2014), porém não evidenciamos este perfil no tecido adiposo em nosso protocolo experimental.

Macrófagos derivados da medula óssea foram tratados em meio rico em lipídios, mimetizando a dieta HL em cultura. O ácido palmitoleico reverteu de forma significativa a expressão gênica e proteica de TNF- α nesses macrófagos (CHAN et al., 2015). Além disso, neste trabalho o ácido palmitoleico promoveu aumento da taxa de consumo de oxigênio em macrófagos (CHAN et al., 2015), assim como promoveu aumento deste parâmetro em adipócitos 3T3-L1 (CRUZ et al., 2018). Em cultura de células musculares C2C12, o ácido palmitoleico preveniu a resistência à insulina nessas células, por inibir a ativação de macrófagos J774 induzida por ácido palmítico (TALBOT, WHEELER-JONES e CLEASBY, 2014). Mais ainda, o ácido palmitoleico reduziu a inflamação de macrófagos ativados por LPS através da inibição de NF-kappa-B (NFkB). Neste trabalho o 16:1n7 reduziu a expressão gênica e proteica de TNF- α , IL-6 e MCP-1 em macrófagos intraperitoneais ativados por LPS, mostrando um relevante efeito anti-inflamatório (SOUZA et al., 2017).

Estas ações anti-inflamatórias que vem sendo descritas para o 16:1n7 ratifica a necessidade de uma análise mais minuciosa no TAB em nosso modelo animal, a fim de melhor compreender o aumento da expressão gênica de *Tnfa* e *Mcp1* aqui encontrados. Nossos resultados podem indicar aumento da inflamação no tecido, muito embora este mecanismo possa ser contra-regulatório, pois sabe-se que o 16:1n7 apresenta ação anti-inflamatória em macrófagos e no fígado (SOUZA et al., 2014; 2017). De forma interessante, camundongos geneticamente modificados apresentando diminuição da sinalização do TNF- α (gene dominante negativo para TNF- α) e induzidos à obesidade por dieta HL por 11 semanas apresentaram aumento da intolerância à glicose. Além disso, filhotes com apenas 10 dias de vida apresentaram diminuição da capacidade adipogênica no tecido adiposo, bem como aumento da esteatose hepática quando a sinalização do TNF- α foi inibida, mostrando que a inflamação aguda no tecido adiposo é essencial para a expansão e remodelamento do tecido

na condição de obesidade (ASTERHOLM et al., 2014). De certa forma, estes dados ratificam o aumento significativo de *Tnfa* nos tecidos adiposos analisados neste protocolo experimental.

Por outro lado, foi reportado que a leptina aumenta a produção de TNF- α e IL-6 em monócitos (SANTOS-ALVAREZ, GOBERNA e SÁNCHEZ-MARGALET, 1999) e que o tratamento com LPS e TNF- α induz o aumento dos níveis de RNAm de leptina nos tecidos adiposos epididimal, omental, renal e subcutâneo de hamsters (GRUNFELD et al., 1996). Além disso, o TNF- α induz aumento dos níveis de RNAm de leptina em adipócitos 3T3-L1 (KIRCHGESSNER et al., 1997). Em meio a estas informações, o aumento da expressão gênica de TNF- α corrobora o aumento da expressão de leptina no grupo que recebeu dieta HL em nosso modelo experimental.

De qualquer forma, sabe-se que a leptina é um importante marcador de massa adiposa corporal (BASTARD et al., 2006), apresentando uma correlação positiva com a mesma, sendo que o aumento da gordura subcutânea apresenta-se como principal fonte de leptina (WRONSKA; KMIEC, 2012). Em concordância com esta informação, nós detectamos um aumento de expressão da leptina neste tecido no grupo de animais obesos, porém o aumento da expressão de leptina não foi tão acentuado no grupo Obeso+n7, mesmo que a expressão de TNF- α tenha sido maior neste grupo.

Além destes achados, a dieta HL promoveu aumento da expressão de *Nos2*, que codifica uma enzima envolvida na produção de óxido nítrico, a óxido nítrico sintase induzível (iNOS ou NOS2) no TAB subcutâneo, bem como apresentou forte tendência de aumento no TAB epididimal ($p = 0,08$). O ácido palmitoleico foi capaz de prevenir parcialmente este efeito. De forma semelhante, foi demonstrado que o ácido palmitoleico promoveu diminuição de NOS2 em macrófagos derivados da medula óssea de camundongos submetidos a dieta HL (CHAN et al., 2015), além de promover aumento de consumo de oxigênio e oxidação de AGs nestes macrófagos, corroborando inclusive nossos dados referentes aos efeitos do 16:1n7 em adipócitos 3T3-L1 (CRUZ et al., 2018).

Finalmente, verificamos um aumento da expressão gênica de *Gpx* no TAB subcutâneo e de *Sod2* no TAB epididimal promovida pela dieta HL. O aumento de oxidação de AGs, bem como de outros substratos energéticos pela mitocôndria, pode levar a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio tais como o ânion superóxido e o peroxinitrito (este último derivado da produção de óxido nítrico pela enzima *óxido nítrico sintase*). Uma hipótese para este efeito é de compensação a fim de lidar com a demanda lipídica promovida pela dieta HL, sugerindo uma tentativa de controlar a formação de radicais livres, pois as enzimas antioxidantes (SOD, Catalase e GPX) são consideradas defesas

endógenas no controle do estresse oxidativo (FARHANGI et al., 2017; LIU et al., 2015). Uma dieta HL por 5 semanas foi capaz de reduzir a atividade das enzimas antioxidantes *catalase* e *glutathione peroxidase* no fígado de ratos (HA; NA; KIM, 2013). Além disso, em nosso protocolo experimental o ácido palmitoleico promoveu aumento da expressão de *Sod1* no TAB subcutâneo, em consonância com nossos resultados em células 3T3-L1, onde o 16:1n7 aumentou a expressão gênica de *Sod1* acompanhado pelo aumento da oxidação de palmitato, da lipogênese e do consumo de oxigênio, bem como do conteúdo de ATP nestas células (CRUZ et al., 2018).

De acordo com nossos resultados, o ácido palmitoleico foi capaz de modular a expressão de genes envolvidos nas atividades metabólicas principais do tecido adiposo (lipólise e lipogênese), bem como na função e biogênese mitocondrial, oxidação de ácidos graxos, adipogênese (diferenciação celular) e alguns genes envolvidos na inflamação. De qualquer maneira, as ações do 16:1n7 são sutis, e os dados sugerem que quando os efeitos impostos pela obesidade e pelo AG são no mesmo sentido, estes se somam, mas se são em sentidos antagônicos, estes são inicialmente sobrepostos pela obesidade induzida pela dieta HL, exceto pelos efeitos gênicos, que não sabemos se e como repercutirão nas atividades metabólicas do adipócito, na homeostase energética e na massa corpórea destes animais à longo prazo.

Tomando como prioridade o estudo do metabolismo no tecido adiposo, o trabalho esteve focado em analisar o efeito do ácido palmitoleico no tecido adiposo de animais obesos. A obesidade induzida neste protocolo está no estágio inicial da mesma. Como as ações do AG ômega-7 utilizado não são tão evidentes neste modelo, os efeitos gênicos causados por este AG ainda não refletem muito no fenótipo do animal, dado pelos resultados dos ensaios metabólicos, massa corpórea, perfil plasmático glicêmico e lipídico e ingestão alimentar, obtidos pelos protocolos experimentais empregados neste estudo. Pode-se sugerir que os efeitos poderão aparecer com um tratamento mais longo (ou com diferentes dosagens do 16:1n7). Pode-se hipotetizar também que há reflexo de mudança na expressão de algumas proteínas envolvidas nos processos metabólicos de vias que os genes analisados se relacionam.

Em suma, a dieta HL consiste num desafio para a regulação da homeostase metabólica e energética dos animais. A obesidade cursa com alterações nas atividades metabólicas do tecido adiposo para se adaptar e/ou sobreviver a esta nova condição imposta. De forma interessante, sob tratamento com ácido palmitoleico, os animais parecem não necessitar tanto destes “ajustes”, suavizando estas alterações (pelo menos em relação à

expressão de genes). De qualquer forma, este estudo carece de mais investigações para melhor elucidar estes efeitos, porém, o que parece é que a suplementação com 16:1n7 não permite que a dieta HL influencie (ou agride) tanto o organismo a se adaptar à condição de obesidade induzida, que é um desafio para o organismo, e a longo prazo, prejudicial. Somando estes dados aos resultados de aumento de oxidação de AGs e estímulo para *browning*, sugerimos também a possibilidade de o tecido adiposo dos animais Obeso+n7 estar mais metabolicamente ativo em relação ao grupo Obeso.

7. CONCLUSÃO

Em animais com obesidade induzida por dieta HL, o ácido palmitoleico:

- apresentou tendência em efetuar diminuição do ganho de massa corpórea;
- diminuiu os triglicérides do fígado;
- aumentou a oxidação de AGs e a lipogênese no tecido adiposo subcutâneo;
- preveniu parcialmente o aumento da expressão gênica de ATGL, HSL, perilipina, lipina, C/EBP- α , PPAR- γ , CPT1, NRF1, TFAM, PRDM16 e NOS2 no TAB subcutâneo;
- preveniu parcialmente o aumento da expressão gênica de HSL, perilipina, e NOS2 no TAB epididimal;
- aumentou a expressão do RNAm de FABP4 e SOD1 no TAB subcutâneo
- diminuiu das enzimas lipogênicas FAS e ACC1 bem como aumentou a expressão gênica de MCP1 e TNF- α nos TAB subcutâneo e epididimal;
- diminuiu a expressão dos gene que codificam a enzima lipogênica FAS no TAM.

Em adipócitos 3T3-L1 sob estímulo de *browning*, o ácido palmitoleico:

- aumentou a expressão da UCP1 (marcador de adipócitos beges/*brite*) e TFAM.

Assim, concluímos que além de promover efeitos *in vitro* (mostrados aqui e em nosso estudo anterior), o ácido palmitoleico também modula parâmetros metabólicos e gênicos do tecido adiposo em animais obesos, prevenindo parcialmente as alterações (em termos de expressão de genes que regulam o metabolismo energético) desencadeadas pela ingestão da dieta HL que levam à disfunção do TAB comumente observada em um organismo obeso.

Os dados sugerem que os animais tratados com o ácido palmitoleico não necessitem da mesma magnitude de adaptação metabólica para lidar com a demanda energética proveniente da dieta HL. Embora não comprovado no presente estudo, postulamos com nossos resultados *in vivo* e *in vitro* que, em longo prazo (tanto no desencadeamento da obesidade, quanto no tempo de suplementação), os efeitos da suplementação com o ácido palmitoleico sejam mais evidentes e, portanto, relevantes e benéficos para a função/disfunção do tecido adiposo de um organismo obeso, com consequente repercussão na homeostase metabólica sistêmica do mesmo.

Além disso, o ácido palmitoleico, através de pequenas alterações promove potencial efeito benéfico sobre a eficiência alimentar, eficiência energética, conteúdo de triglicérides no

fígado, bem como na oxidação e lipogênese do TAB subcutâneo. Portanto, este AG tem possibilidade de auxiliar no tratamento contra a obesidade, visto que estes efeitos foram evidenciados em animais que continuaram a ingerir uma dieta rica em lipídios, mimetizando assim, um indivíduo que possui dificuldade de fazer reeducação alimentar.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIELS, Martin et al. Overproduction of Very Low-Density Lipoproteins Is the Hallmark of the Dyslipidemia in the Metabolic Syndrome. **Arteriosclerosis, Thrombosis, And Vascular Biology**, v. 28, n. 7, p.1225-1236, jul. 2008. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/atvbaha.107.160192>.

ALONSO-VALE, MIC et al. Melatonin and the circadian entrainment of metabolic and hormonal activities in primary isolated adipocytes. **Journal of Pineal Research**, São Paulo, v. 45, n. 4, p. 422-429, 2008.

ARNER, P et al. Beta-adrenoceptor expression in human fat cells from different regions. **Journal Of Clinical Investigation**, v. 86, n. 5, p.1595-1600, 1 nov. 1990. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci114880>.

ASHMORE, Tom et al. Dietary nitrate increases arginine availability and protects mitochondrial complex I and energetics in the hypoxic rat heart. **The Journal Of Physiology**, v.592, n. 21, p.4715-4731, 7 out. 2014. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2014.275263>.

ASTERHOLM, Ingrid et al. Adipocyte Inflammation Is Essential for Healthy Adipose Tissue Expansion and Remodeling. **Cell Metabolism**, v. 20, n. 1, p.103-118, jul. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2014.05.005>.

BARBATELLI, G et al. The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, Ancona, v. 298, n.6, E1244-53, 2010.

BASTARD, J. P., et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. **Eur Cytokine Netw.** v. 17, n. 1, p. 4-12, 2006.

BERRY, Ryan; RODEHEFFER, Matthew S.. Characterization of the adipocyte cellular lineage in vivo. **Nature Cell Biology**, v.15, n. 3, p.302-308, 24 fev. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2696>.

BI, Pengpeng et al. Inhibition of Notch signaling promotes browning of white adipose tissue and ameliorates obesity. **Nature Medicine**, v.20, n. 8, p.911-918, 20 jul. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3615>.

BERTHOLET, Ambre M.; KIRICHOK, Yuriy. UCP1: A transporter for H⁺ and fatty acid anions. **Biochimie**, v.134, p.28-34, mar. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2016.10.013>.

BHATTACHARYYA, AK et al. Differences in adipose tissue fatty acid composition between black and white men in New Orleans. **American Journal of Clinic Nutrition**, New Orleans, v. 46, p. 41-46, 1987.

BOLSONI-LOPES, A. et al. Palmitoleic acid (n-7) increases white adipocyte lipolysis and lipase content in a PPAR -dependent manner. **Ajp: Endocrinology and Metabolism**, v. 305,

n. 9, p.1093-1102, 10 set. 2013. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00082.2013>.

BOLSONI-LOPES, Andressa et al. Palmitoleic acid (n-7) increases white adipocytes GLUT4 content and glucose uptake in association with AMPK activation. **Lipids In Health And Disease**, Diadema, v. 13, n. 1, p.1-10, 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-511x-13-199>.

BORDICCHIA, Marica et al. Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. **Journal Of Clinical Investigation**, v.122, n. 3, p.1022-1036, 1 mar. 2012. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci59701>.

BOSTRÖM, Pontus et al. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. **Nature**, v.481, n. 7382, p.463-468, 11 jan. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature10777>.

BOURNAT, Juan C; BROWN, Chester W. Mitochondrial dysfunction in obesity. **Current Opinion In Endocrinology, Diabetes And Obesity**, v.17, n. 5, p.446-452, out. 2010. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/med.0b013e32833c3026>.

BRASAEMLE, Dawn L. et al. Perilipin A Increases Triacylglycerol Storage by Decreasing the Rate of Triacylglycerol Hydrolysis. **Journal Of Biological Chemistry**, v.275, n. 49, p.38486-38493, 17 ago. 2000. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m007322200>.

CAMPIOLI, Enrico et al. Morphological and Receptorial Changes in the Epididymal Adipose Tissue of Rats Subjected to a Stressful Stimulus. **Obesity**, v.19, n. 4, p.703-708, 14 out. 2010. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1038/oby.2010.244>.

CAO, Haiming et al. Identification of a Lipokine, a Lipid Hormone Linking Adipose Tissue to Systemic Metabolism. **Cell**, Si, v. 134, n. 6, p.933-944, set. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.048>.

CHAN, David C.. Mitochondria: Dynamic Organelles in Disease, Aging, and Development. **Cell**, v.125, n. 7, p.1241-1252, jun. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.010>.

CHAN, Kenny L. et al. Palmitoleate Reverses High Fat-induced Proinflammatory Macrophage Polarization via AMP-activated Protein Kinase (AMPK). **Journal Of Biological Chemistry**, v.290, n. 27, p.16979-16988, 18 maio 2015. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m115.646992>.

CHOI, Jae Heon et al. Monoterpene phenolic compound thymol promotes browning of 3T3-L1 adipocytes. **European Journal Of Nutrition**, v. 56, n. 7, p.2329-2341, 18 jul. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00394-016-1273-2>.

COUSIN, B. Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization. **Journal of Cell Science** 103, 931-942,1992.

CRUZ, Maysa M. et al. Palmitoleic acid (16:1n7) increases oxygen consumption, fatty acid oxidation and ATP content in white adipocytes. **Lipids In Health And Disease**, v. 17, n. 1, p.1-12, 20 mar. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12944-018-0710-z>.

CYPESS, Aaron m. et al. Activation of Human Brown Adipose Tissue by a β 3-Adrenergic Receptor Agonist. **Cell Metabolism**, v. 21, n. 1, p.33-38, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.009>.

DELGADO, T. C. et al. Sources of hepatic triglyceride accumulation during high-fat feeding in the healthy rat. **Nmr In Biomedicine**, v.22, n. 3, p.310-317, abr. 2009. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/nbm.1327>.

DELZENNE, N, et al. Study of the regulation by nutrients of the expression of genes involved in lipogenesis and obesity in humans and animals. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**. 2001.

DIAKOGIANNAKI, E. et al. Mechanisms involved in the cytotoxic and cytoprotective actions of saturated versus monounsaturated long-chain fatty acids in pancreatic - cells. **Journal Of Endocrinology**, v.194, n. 2, p.283-291, 1 ago. 2007. BioScientifica. <http://dx.doi.org/10.1677/joe-07-0082>.

DIMOPOULOS, Nikolaos et al. Differential effects of palmitate and palmitoleate on insulin action and glucose utilization in rat L6 skeletal muscle cells. **Biochemical Journal**, v. 399, n. 3, p.473-481, 1 nov. 2006. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/bj20060244>.

DUARTE, Joao A. G. et al. A high-fat diet suppresses de novo lipogenesis and desaturation but not elongation and triglyceride synthesis in mice. **Journal Of Lipid Research**, v.55, n. 12, p.2541-2553, 30 set. 2014. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.m052308>.

DUCHARME, Nicole A.; BICKEL, Perry E.. Minireview: Lipid Droplets in Lipogenesis and Lipolysis. **Endocrinology**, v.149, n. 3, p.942-949, mar. 2008. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2007-1713>.

DUCLUZEAU, Pierre-henri et al. Dynamic regulation of mitochondrial network and oxidative functions during 3T3-L1 fat cell differentiation. **Journal Of Physiology And Biochemistry**, v.67, n. 3, p.285-296, 26 jan. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s13105-011-0074-6>.

ENGIN, Atilla. Fat Cell and Fatty Acid Turnover in Obesity. **Obesity and Lipotoxicity**, Advances in Experimental Medicine and Biology 960, 2017. DOI 10.1007/978-3-319-48382-5_6.

FARHANGI, Mahdiah Abbasalizad et al. Adipose Tissue Inflammation and Oxidative Stress: the Ameliorative Effects of Vitamin D. **Inflammation**, v. 40, n. 5, p.1688-1697, 3 jul. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10753-017-0610-9>.

FARMER, Stephen R. Brown Fat and Skeletal Muscle: Unlikely Cousins?. **Cell**, v. 134, n. 5, p.726-727, set. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.018>.

FARMER, Stephen R. Transcriptional control of adipocyte formation. **Cell Metabolism**, v. 4, n. 4, p.263-273, out. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2006.07.001>.

FELDMANN, Helena M. et al. UCP1 Ablation Induces Obesity and Abolishes Diet-Induced Thermogenesis in Mice Exempt from Thermal Stress by Living at Thermoneutrality. **Cell Metabolism**, v.9, n. 2, p.203-209, fev. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2008.12.014>.

FERRANTI, S. de; MOZAFFARIAN, D.. The Perfect Storm: Obesity, Adipocyte Dysfunction, and Metabolic Consequences. **Clinical Chemistry**, v. 54, n. 6, p.945-955, 10 abr. 2008. American Association for Clinical Chemistry (AACC). <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2007.100156>.

FINE JB, DIGIROLAMO M. A simple method to predict cellular density in adipocyte metabolic incubations. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1997;21(9):764-8.

FISHER, F. M. et al. FGF21 regulates PGC-1 and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. **Genes & Development**, v.26, n. 3, p.271-281, 1 fev. 2012. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.177857.111>.

FRASER, DA et al. Changes in plasma free fatty acid concentrations in rheumatoid arthritis patients during fasting and their effects upon T-lymphocyte proliferation. **Rheumatology (Oxford)**, Oslo, v. 38, n. 10, p. 948-952, 1999.

FRIEDEWALD, William T.; LEVY, Robert I.; FREDRICKSON, Donald S.. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, Rockville, v. 18, n. 6, p.499-502, mar. 1972.

GAO, Chun-lin et al. Mitochondrial dysfunction is induced by high levels of glucose and free fatty acids in 3T3-L1 adipocytes. **Molecular And Cellular Endocrinology**, v.320, n. 1-2, p.25-33, maio 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2010.01.039>.

GARAULET, Marta et al. Relation between degree of obesity and site-specific adipose tissue fatty acid composition in a Mediterranean population. **Nutrition**, v. 27, n. 2, p.170-176, fev. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2010.01.004>.

GESTA, Stephane; TSENG, Yu-hua; KAHN, C. Ronald. Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source. **Cell**, v. 131, n. 2, p.242-256, out. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.004>.

GONÇALVES, Leidyanne Ferreira et al. Ageing is associated with brown adipose tissue remodelling and loss of white fat browning in female C57BL/6 mice. **International Journal Of Experimental Pathology**, v.98, n. 2, p.100-108, abr. 2017. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/iep.12228>.

GRANNEMAN, James G. et al. Metabolic and cellular plasticity in white adipose tissue I: effects of β 3-adrenergic receptor activation. **American Journal Of Physiology-endocrinology And Metabolism**, v. 289, n. 4, p.608-616, out. 2005. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00009.2005>.

GRUNFELD, C et al. Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters. **Journal Of Clinical Investigation**, v.97, n. 9, p.2152-2157, 1 maio 1996. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci118653>.

GUZZARDI, Maria Angela et al. Elevated glycemia and brain glucose utilization predict BDNF lowering since early life. **Journal Of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, p.1-9, 10 mar. 2017. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/0271678x17697338>.

HA, Ae Wha; NA, Se Jung; KIM, Woo Kyoung. Antioxidant effects of fucoxanthin rich powder in rats fed with high fat diet. **Nutrition Research And Practice**, v. 7, n. 6, p.475-480, 2013. The Korean Nutrition Society and The Korean Society of Community Nutrition (KAMJE). <http://dx.doi.org/10.4162/nrp.2013.7.6.475>.

HAN, Shu-fen et al. Lipolysis and thermogenesis in adipose tissues as new potential mechanisms for metabolic benefits of dietary fiber. **Nutrition**, v.33, p.118-124, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2016.05.006>.

HARVEY, Richard A; FERRIER, Denise R. **Bioquímica Ilustrada**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

HIRABARA, Sandro Massao et al. **Ácidos Graxos Na Saúde e Na Doença: Influência da Genética, Nutrição, Exercício Físico e Esporte**. São Paulo: Crv, 2015.

HIRAOKA-YAMAMOTO, Junko et al. Serum lipid effects of a monounsaturated (palmitoleic) fatty acid-rich diet based on macadamia nuts in healthy, young japanese women. **Clinical And Experimental Pharmacology And Physiology**, v. 31, n. 2, p.37-38, dez. 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1681.2004.04121.x>.

HIRSCH, Jules; BATCHELOR, Bruce. Adipose tissue cellularity in human obesity. **Clinics In Endocrinology And Metabolism**, v. 5, n. 2, p.299-311, jul. 1976. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0300-595x\(76\)80023-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0300-595x(76)80023-0).

HODGE, Allison M. et al. Plasma phospholipid fatty acid composition as a biomarker of habitual dietary fat intake in an ethnically diverse cohort. **Nutrition, Metabolism And Cardiovascular Diseases**, v. 17, n. 6, p.415-426, jul. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.numecd.2006.04.005>.

HODSON, Leanne; KARPE, Fredrik. Is there something special about palmitoleate? **Current Opinion In Clinical Nutrition And Metabolic Care**, v. 16, n. 2, p.225-231, mar. 2013. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/mco.0b013e32835d2edf>.

HODSON, Leanne; SKEAFF, C. Murray; FIELDING, Barbara A.. Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. **Progress In Lipid Research**, v. 47, n. 5, p.348-380, set. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2008.03.003>.

HONDARES, Elayne et al. Peroxisome Proliferator-activated Receptor α (PPAR α) Induces PPAR γ Coactivator 1 α (PGC-1 α) Gene Expression and Contributes to Thermogenic Activation of Brown Fat. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 286, n. 50, p.43112-43122,

27 out. 2011. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m111.252775>.

HOROWITZ, Jeffrey F; KLEIN, Samuel. Lipid metabolism during endurance exercise. **The American Journal Of Clinical Nutrition**, v. 72, n. 2, p.558-563, 1 ago. 2000. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/72.2.558s>.

IBRAHIM, M. Mohsen. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. **Obesity Reviews**, v. 11, n. 1, p.11-18, jan. 2010. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1467-789x.2009.00623.x>.

IWASA, Takeshi et al. Developmental changes in the hypothalamic mRNA expression levels of brain-derived neurotrophic factor and serum leptin levels: Their responses to fasting in male and female rats. **International Journal Of Developmental Neuroscience**, v.54, p.1-5, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2016.08.001>.

JENSEN, Michael D. LIPOLYSIS: Contribution from Regional Fat. **Annual Review Of Nutrition**, v. 17, n. 1, p.127-139, jul. 1997. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.nutr.17.1.127>.

JOE, Aaron W.b. et al. Depot-Specific Differences in Adipogenic Progenitor Abundance and Proliferative Response to High-Fat Diet. **Stem Cells**, v.27, n. 10, p.2563-2570, out. 2009. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/stem.190>.

KAIJSER, A; DUTTA, P; SAVAGE, G. Oxidative stability and lipid composition of macadamia nuts grown in New Zealand. **Food Chemistry**, Uppsala, v. 71, n. 1, p.67-70, out. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0308-8146\(00\)00132-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0308-8146(00)00132-1).

KALLIO, Heikki et al. Triacylglycerols, Glycerophospholipids, Tocopherols, and Tocotrienols in Berries and Seeds of Two Subspecies (ssp.sinensis and mongolica) of Sea Buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*). **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 50, n. 10, p.3004-3009, maio 2002. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf011556o>.

KAJIMURA, Shingo; SAITO, Masayuki. A New Era in Brown Adipose Tissue Biology: Molecular Control of Brown Fat Development and Energy Homeostasis. **Annual Review Of Physiology**, v.76, n. 1, p.225-249, 10 fev. 2014. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-physiol-021113-170252>.

KERSHAW, Erin E.; FLIER, Jeffrey S.. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. **The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 6, p.2548-2556, jun. 2004. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2004-0395>.

KERSTEN, Sander. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. **Embo Reports**, v. 2, n. 4, p.282-286, abr. 2001. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1093/embo-reports/kve071>.

KIRCHGESSNER, T G et al. Tumor necrosis factor-alpha contributes to obesity-related hyperleptinemia by regulating leptin release from adipocytes. **Journal Of Clinical**

Investigation, v.100, n. 11, p.2777-2782, 1 dez. 1997. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci119824>.

KLEINER, S. et al. Development of insulin resistance in mice lacking PGC-1 in adipose tissues. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 109, n. 24, p.9635-9640, 29 maio 2012. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1207287109>.

KOLTES, D.a.; SPURLOCK, M.e.; SPURLOCK, D.m.. Adipose triglyceride lipase protein abundance and translocation to the lipid droplet increase during leptin-induced lipolysis in bovine adipocytes. **Domestic Animal Endocrinology**, v.61, p.62-76, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.domaniend.2017.06.001>.

KOPONEN, Taina et al. The activation of hepatic and muscle polyamine catabolism improves glucose homeostasis. **Amino Acids**, v.42, n. 2-3, p.427-440, 4 ago. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-011-1013-0>.

KUNESOVÁ, Marie et al. Assessment of dietary and genetic factors influencing serum and adipose fatty acid composition in obese female identical twins. **Lipids**, v. 37, n. 1, p.27-32, jan. 2002. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1007/s11745-002-0860-z>.

LASS, Achim et al. Lipolysis – A highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. **Progress In Lipid Research**, v.50, n. 1, p.14-27, jan. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2010.10.004>.

LEE, Ji-hyun et al. Effect of Enzymatic Treatment of Chrysanthemum indicum Linné Extracts on Lipid Accumulation and Adipogenesis in High-Fat-Diet-Induced Obese Male Mice. **Nutrients**, v. 269, n. 11, p.1-14, 25 jan. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu11020269>.

LEE, Yun-hee et al. In Vivo Identification of Bipotential Adipocyte Progenitors Recruited by β 3-Adrenoceptor Activation and High-Fat Feeding. **Cell Metabolism**, v. 15, n. 4, p.480-491, abr. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2012.03.009>.

LIAO, Guey-ying et al. Dendritically targeted Bdnf mRNA is essential for energy balance and response to leptin. **Nature Medicine**, v.18, n. 4, p.564-571, 18 mar. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2687>.

LIM, Sharon et al. Cold-induced activation of brown adipose tissue and adipose angiogenesis in mice. **Nature Protocols**, v.7, n. 3, p.606-615, 1 mar. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2012.013>.

LIU, Wensheng et al. Antioxidant Mechanisms in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Current Drug Targets**, v. 16, n. 12, p.1301-1314, 14 out. 2015. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1389450116666150427155342>.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D.. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v.25, n. 4, p.402-408, dez. 2001. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

LONE, Jameel; YUN, Jong Won. Monoterpene limonene induces brown fat-like phenotype in 3T3-L1 white adipocytes. **Life Sciences**, v. 153, p.198-206, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2016.04.010>.

MAECHLER, Pierre; WOLLHEIM, Claes B.. Mitochondrial function in normal and diabetic β -cells. **Nature**, v. 414, n. 6865, p.807-812, dez. 2001. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/414807a>.

MAEDA, Kazuhisa et al. Adipocyte/macrophage fatty acid binding proteins control integrated metabolic responses in obesity and diabetes. **Cell Metabolism**, v. 1, n. 2, p.107-119, fev. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2004.12.008>.

MASI, Laureane Nunes et al. Combination of a high-fat diet with sweetened condensed milk exacerbates inflammation and insulin resistance induced by each separately in mice. **Scientific Reports**, v.7, n. 1, p.1-10, 21 jun. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-04308-1>.

MARZZOCO, A; TORRES, BB. **Bioquímica Básica**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

MOISAN, Annie et al. White-to-brown metabolic conversion of human adipocytes by JAK inhibition. **Nature Cell Biology**, v.17, n. 1, p.57-67, 8 dez. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb3075>.

MORGAN, Noel G.; DHAYAL, Shaline. Unsaturated fatty acids as cytoprotective agents in the pancreatic β -cell. **Prostaglandins, Leukotrienes And Essential Fatty Acids (plefa)**, v. 82, n. 4-6, p.231-236, abr. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plefa.2010.02.018>.

MORRISON RF, FARMER SR. Insights into the transcriptional control of adipocyte differentiation. **J Cell Biochem**, 1999.

MORRISON, Ron F.; FARMER, Stephen R.. Hormonal Signaling and Transcriptional Control of Adipocyte Differentiation. **The Journal Of Nutrition**, v. 130, n. 12, p.3116-3121, 1 dez. 2000. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jn/130.12.3116s>.

NOROUZIRAD, Reza et al. Hyperoxia improves carbohydrate metabolism by browning of white adipocytes in obese type 2 diabetic rats. **Life Sciences**, v. 220, p.58-68, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2019.01.045>.

NTAMBI, James M.; YOUNG-CHEUL, Kim. Adipocyte Differentiation and Gene Expression. **The Journal Of Nutrition**, v. 130, n. 12, p.3122-3126, 1 dez. 2000. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jn/130.12.3122s>.

OHNO, Haruya et al. PPAR γ agonists Induce a White-to-Brown Fat Conversion through Stabilization of PRDM16 Protein. **Cell Metabolism**, v. 15, n. 3, p.395-404, mar. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2012.01.019>.

OKADA, T et al. Plasma palmitoleic acid content and obesity in children. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Tokyo, v. 82, n. 4, p. 747-750, 2005.

PETRIDOU, Anatoli et al. Increased Triacylglycerol Lipase Activity in Adipose Tissue of Lean and Obese Men During Endurance Exercise. **The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism**, p.1-14, 12 jun. 2017. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2017-00168>.

PROENÇA, A.r.g. et al. New concepts in white adipose tissue physiology. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, v.47, n. 3, p.192-205, fev. 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431x20132911>.

RADONIĆ, Aleksandar et al. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v.313, n. 4, p.856-862, jan. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.11.177>.

RASK-MADSEN, C.; KAHN, C. R.. Tissue-Specific Insulin Signaling, Metabolic Syndrome, and Cardiovascular Disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, And Vascular Biology**, v.32, n. 9, p.2052-2059, 15 ago. 2012. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/atvbaha.111.241919>.

RODEHEFFER, Matthew S.; BIRSOY, Kıvanç; FRIEDMAN, Jeffrey M.. Identification of White Adipocyte Progenitor Cells In Vivo. **Cell**, v.135, n. 2, p.240-249, out. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.036>.

ROMACHO, T. et al. Adipose tissue and its role in organ crosstalk. **Acta Physiologica**, v.210, n. 4, p.733-753, 25 fev. 2014. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/apha.12246>.

ROSEN, ED; SPIEGELMAN, BM. Molecular regulation of adipo- genesis. **Annu Rev Cell Dev Biol** 2000; 16:145–171.

ROSENWALD, Matthias et al. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. **Nature Cell Biology**, v.15, n. 6, p.659-667, 28 abr. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2740>.

ROSENWALD, M; WOLFRUM, C.,. The origin and definition of brite versus white and classical brown adipocytes. **Adipocyte**. 3 (1), 4-9, 2014.

SÁ, Roberta D. C. da Cunha de et al. Fish oil prevents changes induced by a high-fat diet on metabolism and adipokine secretion in mice subcutaneous and visceral adipocytes. **The Journal Of Physiology**, v.594, n. 21, p.6301-6317, 25 ago. 2016. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1113/jp272541>.

SAITO, M. Brown adipose tissue as a regulator of energy expenditure and body fat in humans. **Diabetes Metab J**. 37 (1), 22-9, 2013.

SANTOS-ALVAREZ, José; GOBERNA, Raimundo; SÁNCHEZ-MARGALET, Victor. Human Leptin Stimulates Proliferation and Activation of Human Circulating Monocytes. **Cellular Immunology**, v. 194, n. 1, p.6-11, maio 1999. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/cimm.1999.1490>.

SCHRIJVER, Benjamin et al. Basic Fibroblast Growth Factor Induces Adipogenesis in Orbital Fibroblasts: Implications for the Pathogenesis of Graves' Orbitopathy. **Thyroid**, p.1-30, 27 fev. 2019. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/thy.2018.0544>.

SCHWEIGER, Martina et al. G0/G1 switch gene-2 regulates human adipocyte lipolysis by affecting activity and localization of adipose triglyceride lipase. **Journal Of Lipid Research**, v. 53, n. 11, p.2307-2317, 13 ago. 2012. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.m027409>.

SEALE, Patrick et al. Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. **Journal Of Clinical Investigation**, v. 121, n. 1, p.96-105, 4 jan. 2011. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci44271>.

SEALE, Patrick et al. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. **Nature**, v. 454, n. 7207, p.961-967, 21 ago. 2008. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature07182>.

SEO, Young-jin et al. Spirulina maxima Extract Reduces Obesity through Suppression of Adipogenesis and Activation of Browning in 3T3-L1 Cells and High-Fat Diet-Induced Obese Mice. **Nutrients**, v. 10, n. 10, p.1-15, 1 jun. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu10060712>.

SILVEIRA, Maruhen A.d. et al. Mitochondrial-related gene associated to obesity can be modulated by in utero hyperglycemic environment. **Reproductive Toxicology**, v. 85, p.59-64, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2019.02.001>.

SILVÉRIO, Renata et al. Lipases and lipid droplet-associated protein expression in subcutaneous white adipose tissue of cachectic patients with cancer. **Lipids In Health And Disease**, v.16, n. 1, p.1-11, 22 ago. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12944-017-0547-x>.

SMORLESI, A. et al. The adipose organ: white-brown adipocyte plasticity and metabolic inflammation. **Obesity Reviews**, v. 13, p.83-96, 29 out. 2012. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1467-789x.2012.01039.x>.

SOUZA, Camila O et al. Palmitoleic acid reduces the inflammation in LPS-stimulated macrophages by inhibition of NFκB, independently of PPARs. **Clinical And Experimental Pharmacology And Physiology**, v. 44, n. 5, p.566-575, 21 abr. 2017. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/1440-1681.12736>.

SOUZA, Camila O. et al. Palmitoleic Acid (N-7) Attenuates the Immunometabolic Disturbances Caused by a High-Fat Diet Independently of PPARα. **Mediators Of Inflammation**, v. 2014, p.1-12, 2014. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/582197>.

SPALDING, Kirsty L. et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. **Nature**, v. 453, n. 7196, p.783-787, 4 maio 2008. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature06902>.

STOECKMAN, AK; TOWLE HC. The role of SREBP-1c in nutritional regulation of lipogenic enzyme gene expression. **J Biol Chem**. 2002 ;277(30):27029-35.

SUAREZ, J. et al. Oleoylethanolamide enhances -adrenergic-mediated thermogenesis and white-to-brown adipocyte phenotype in epididymal white adipose tissue in rat. **Disease Models & Mechanisms**, v. 7, n. 1, p.129-141, 23 out. 2013. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/dmm.013110>.

TALBOT, Nicola A.; WHEELER-JONES, Caroline P.; CLEASBY, Mark E. Palmitoleic acid prevents palmitic acid-induced macrophage activation and consequent p38 MAPK-mediated skeletal muscle insulin resistance. **Molecular And Cellular Endocrinology**, v. 393, n. 1-2, p.129-142, ago. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2014.06.010>.

TANG, W. et al. White Fat Progenitor Cells Reside in the Adipose Vasculature. **Science**, v. 322, n. 5901, p.583-586, 24 out. 2008. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1156232>.

TORTORA. G. J.; DERRICKSON, B. **Princípios de anatomia e fisiologia**. Guanabara Koogan, 2014.

TRAN, Khanh-van et al. The Vascular Endothelium of the Adipose Tissue Gives Rise to Both White and Brown Fat Cells. **Cell Metabolism**, v. 15, n. 2, p.222-229, fev. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2012.01.008>.

UYEDA, Kosaku; YAMASHITA, Hiromi; KAWAGUCHI, Takumi. Carbohydrate responsive element-binding protein (ChREBP): a key regulator of glucose metabolism and fat storage. **Biochemical Pharmacology**, v. 63, n. 12, p.2075-2080, jun. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0006-2952\(02\)01012-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0006-2952(02)01012-2).

VALERIO, A. TNF- α downregulates eNOS expression and mitochondrial biogenesis in fat and muscle of obese rodents. **Journal Of Clinical Investigation**, v. 116, n. 10, p.2791-2798, 2 out. 2006. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci28570>.

VÁZQUEZ-VELA, ME; TORRES, N; TOVAR, AR. White Adipose Tissue as Endocrine Organ and Its Role in Obesity. **Archives of medical research**, Cidade do México, v. 39, p. 715-728, 2008.

VENTURA-CLAPIER, R.; GARNIER, A.; VEKSLER, V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1. **Cardiovascular Research**, v.79, n. 2, p.208-217, 30 abr. 2008. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvn098>.

VIRTUE, Sam; VIDAL-PUIG, Antonio. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome — An allostatic perspective. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular And Cell Biology Of Lipids**, v. 1801, n. 3, p.338-349, mar. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.12.006>.

VISHVANATH, Lavanya et al. Pdgfr β + Mural Preadipocytes Contribute to Adipocyte Hyperplasia Induced by High-Fat-Diet Feeding and Prolonged Cold Exposure in Adult Mice. **Cell Metabolism**, v.23, n. 2, p.350-359, fev. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.10.018>.

WANG, Tong et al. Metabolic Partitioning of Endogenous Fatty Acid in Adipocytes. **Obesity Research**, v.11, n. 7, p.880-887, jul. 2003. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1038/oby.2003.121>.

WANG, Qiong et al. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. **Nature Medicine**, v.19, n. 10, p.1338-1344, 1 set. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3324>

WARFEL, Jaycob D et al. Examination of carnitine palmitoyltransferase 1 abundance in white adipose tissue: implications in obesity research. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. 2017 May 1;312(5):R816-R820. doi: 10.1152/ajpregu.00520.2016.

WILSON-FRITCH, Leanne et al. Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. **Journal Of Clinical Investigation**, v.114, n. 9, p.1281-1289, 1 nov. 2004. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci21752>.

WRONSKA, A.; KMIEC, Z. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. **Acta Physiologica**, v.205, n. 2, p.194-208, 1 fev. 2012. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-1716.2012.02409.x>.

WU, Jun et al. Beige Adipocytes Are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human. **Cell**, v. 150, n. 2, p.366-376, jul. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.016>.

XU, Baoji; XIE, Xiangyang. Neurotrophic factor control of satiety and body weight. **Nature Reviews Neuroscience**, v.17, n. 5, p.282-292, 7 abr. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn.2016.24>.

XUE, B. et al. Transcriptional Synergy and the Regulation of Ucp1 during Brown Adipocyte Induction in White Fat Depots. **Molecular And Cellular Biology**, v. 25, n. 18, p.8311-8322, 31 ago. 2005. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/mcb.25.18.8311-8322.2005>.

YAMANAKA, M. et al. Brain-derived neurotrophic factor enhances glucose utilization in peripheral tissues of diabetic mice. **Diabetes, Obesity And Metabolism**, v.9, n. 1, p.59-64, jan. 2007. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-1326.2006.00572.x>.

YANG, Zhi-hong; MIYAHARA, Hiroko; HATANAKA, Akimasa. Chronic administration of palmitoleic acid reduces insulin resistance and hepatic lipid accumulation in KK-Ay Mice with genetic type 2 diabetes. **Lipids In Health And Disease**, v.10, n. 1, p.1-8, 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-511x-10-120>.

YEH, W C et al. Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. **Genes & Development**, v. 9, n. 2, p.168-181, 15 jan. 1995. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.9.2.168>.

YOUNG, P.; ARCH, J.r.s.; ASHWELL, Margaret. Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. **Febs Letters**, v.167, n. 1, p.10-14, 13 fev. 1984. Wiley-Blackwell. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(84\)80822-4](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(84)80822-4)

9. APÊNDICES

Apêndice A – Documento da aprovação do trabalho no comitê de ética em pesquisa (CEP).



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



, 27 de abril de 2015

CEUA N 8347020315

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): Maysa Mariana Cruz

Depto/Disc: Departamento De Ciências Biológicas

Maria Isabel Cardoso Alonso Vale (orientador)

Título do projeto: "Efeitos metabólicos do ácido palmitoleico sobre o tecido adiposo marrom e sobre o aparecimento de adipócitos marrons ou "beges" no tecido adiposo branco".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP/HSP

O tecido adiposo (TA) é um órgão endócrino, especializado em reservar energia na forma de triacilgliceróis (TAG). Há dois tipos de tecido adiposo, o TA branco e marrom (TAB e TAM, respectivamente). O TAB, tem como principal função o acúmulo de TAG, fornecendo ácidos graxos de acordo com a demanda energética do indivíduo. O TAM tem como principal função a produção de calor via desacoplamento mitocondrial pela proteína desacopladora 1 (UCP1). Estudos sugerem que o aumento da capacidade oxidativa tanto do TAB como do TAM aumentam o gasto energético do organismo. O aumento desta capacidade oxidativa e/ou termogênica do TAB é alvo para terapias contra doenças relacionadas com a obesidade, como diabetes mellitus do tipo 2 (DMT2), dislipidemias e doenças cardiovasculares. Assim, a possibilidade de promover o browning (brown in white) do TAB passa ser considerado de extrema relevância. O ácido palmitoleico (C16:1n7) é um ácido graxo monoinsaturado, com 16 carbonos e foi descrito como uma lipocina produzida e secretada pelo tecido adiposo. Dados recentes revelaram que, in vitro, o C16:1n7 aumenta a capacidade oxidativa de adipócitos brancos (3T3-L1) bem como alguns parâmetros bioenergéticos, relacionados à função mitocondrial destas células. O objetivo deste trabalho é investigar os efeitos "in vivo" do C16:1n7 sobre o browning ou aparecimento de adipócitos marrons ou beges no TAB, analisando a expressão de marcadores de TAM em associação com alterações de parâmetros mitocondriais relacionados à bioenergética, biogênese e função mitocondrial, bem como os efeitos deste AG sobre o metabolismo de adipócitos marrons. Para isso serão utilizados camundongos C57Bl/6, tratados por 15 dias com ácido palmitoleico. Tecidos adiposos branco e marrom serão retirados para as seguintes análises: lipólise, lipogênese, oxidação de glicose e beta-oxidação de ácidos graxos, consumo de oxigênio, espécies reativas de oxigênio, análises gênicas e proteicas de marcadores de browning do TAB (UCP1, UCP2, PRDM16, FGF21), bem como análise de marcadores bioenergéticos (CPT1 e 2, OXPHOS, Tfam, NRF1 e 2, PGC1alpha) em relação à função mitocondrial destes adipócitos.

ANIMAIS:

Serão utilizados:

- 80 Camundongos isogênicos C57Bl/6, Machos, idade: 8 semanas

Procedência: CEDEME/UNIFESP.

Manutenção: Biotério Central da Unifesp Diadema

VIGÊNCIA DO ESTUDO:

início previsto para: 04/2015 com término previsto para: 03/2019

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, na reunião de 27/04/2015, **ANALISOU** e **APROVOU** todos os procedimentos apresentados neste protocolo.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Atenciosamente

Profa. Dra. Monica Levy Andersen
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

Apêndice B - CRUZ, et al. Lipids in Health and Disease, v. 17, p. 55, 2018.

RESEARCH

Open Access



Palmitoleic acid (16:1n7) increases oxygen consumption, fatty acid oxidation and ATP content in white adipocytes

Maysa M. Cruz¹, Andressa B. Lopes⁴, Amanda R. Crisma², Roberta C. C. de Sá¹, Wilson M. T. Kuwabara², Rui Curi^{2,3}, Paula B. M. de Andrade³ and Maria I. C. Alonso-Vale^{1*}

Abstract

Background: We have recently demonstrated that palmitoleic acid (16:1n7) increases lipolysis, glucose uptake and glucose utilization for energy production in white adipose cells. In the present study, we tested the hypothesis that palmitoleic acid modulates bioenergetic activity in white adipocytes.

Methods: For this, 3 T3-L1 pre-adipocytes were differentiated into mature adipocytes in the presence (or absence) of palmitic (16:0) or palmitoleic (16:1n7) acid at 100 or 200 μ M. The following parameters were evaluated: lipolysis, lipogenesis, fatty acid (FA) oxidation, ATP content, oxygen consumption, mitochondrial mass, citrate synthase activity and protein content of mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) complexes.

Results: Treatment with 16:1n7 during 9 days raised basal and isoproterenol-stimulated lipolysis, FA incorporation into triacylglycerol (TAG), FA oxidation, oxygen consumption, protein expression of subunits representing OXPHOS complex II, III, and V and intracellular ATP content. These effects were not observed in adipocytes treated with 16:0.

Conclusions: Palmitoleic acid, by concerted action on lipolysis, FA esterification, mitochondrial FA oxidation, oxygen consumption and ATP content, does enhance white adipocyte energy expenditure and may act as local hormone.

Keywords: Lipogenesis, Lipolysis, Triglyceride/fatty acid cycle, Bioenergetics, Mitochondria, Beta-oxidation

Background

White adipose tissue (WAT) stores triacylglycerol (TAG) and its metabolic feature involves lipogenesis and lipolysis, which are associated with changes in the volume of mature adipocytes. The activities of these two metabolic pathways vary with the need to incorporate or release fatty acids (FA), which depends on the nutritional status of the individuals, energy expenditure, hormone levels (e.g. insulin), activities of the enzymes involved in these processes (e.g. ATGL and HSL, FAS and G6PDH) and the heterogeneity existing among white adipose tissue depots [1–3].

Mitochondria play an important role in cellular function, not only as a major site of ATP production, but also by regulating energy expenditure, apoptosis signaling and

production of reactive oxygen species [4]. The impact of mitochondria function and dysfunction on pre-adipocyte and adipocyte metabolism has attracted a growing body of interest over the last decade [5–7]. There are several reports linking mitochondrial dysfunction with impaired WAT energetic metabolism and the development of obesity, insulin resistance and type 2 diabetes mellitus (T2DM) [6, 8, 9]. Mitochondria are the main site for aerobic glucose and fatty acid oxidation, oxygen consumption, and generation of reactive oxygen species and ATP, which are associated with enhanced basal metabolic rate [10, 11]. Therefore, mitochondria function in WAT might play a key role to control basal metabolic rate and should be considered as a target to be investigated for the development of alternative therapies to treat/prevent obesity and related metabolic disorders.

Among several types of lipids produced and released by adipocytes, palmitoleic acid, a ω -7 monounsaturated fatty acid (16:1n7, n7) synthesized by the desaturation of

* Correspondence: alonsovale@gmail.com

¹Department of Biological Sciences, Institute of Environmental Sciences, Chemical and Pharmaceutical, Federal University of São Paulo, 210, São Nicolau St, Diadema 09913-030, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

palmitic acid (16:0) by stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) activity, has been shown to act systemically in peripheral tissues modulating important metabolic processes. Cao and cols [12] showed that palmitoleic acid improves insulin resistance in skeletal muscle and liver and prevents hepatosteatosis. As palmitoleic acid is produced and secreted by WAT, Cao and cols., 2008 [12] named it “lipokine”. Palmitoleic acid treatment leads to increased glucose uptake, AKT phosphorylation and raises GLUT1 and GLUT4 protein levels in plasma membrane of skeletal muscle cells [13, 14]. Moreover, palmitoleic acid treatment also enhances AKT, insulin receptor, insulin receptor substrate-1 and 2 protein phosphorylation in the liver [12, 15] and exerts cytoprotective effects in pancreatic β -cells [16, 17].

We investigated herein the effects of palmitoleic acid on WAT bioenergetics. Recently, our group has shown that palmitoleic acid treatment increases adipocyte lipolysis and the content of the major lipases (ATGL and HSL) through a PPAR α -dependent mechanism [18]. Besides, this lipokine enhanced glucose uptake and GLUT4 content associated with AMPK activation in these cells, favoring cellular glucose utilization towards energy production [19]. Our hypothesis is that palmitoleic acid increases white adipocyte basal metabolism. To test this proposition, 3 T3-L1 adipocytes were treated with palmitoleic acid (100 μ M) for 9 days. The results were compared with those obtained with palmitic acid and vehicle under similar experimental protocol. Lipolysis, FA incorporation into lipids and FA conversion into CO₂, as well as parameters of mitochondrial bioenergetics (fatty acid oxidation, oxygen consumption and ATP content) and proteic analysis of subunits representing OXPHOS complex (I, II, III, IV e V) were investigated. Treatment with palmitoleic acid did enhance mitochondrial activity as indicated by enhanced ATP generation, proteic expression of II, III, and V complexes of the mitochondrial electron transport chain, FA oxidation and oxygen consumption. Taken together, boosted mitochondrial bioenergetics in combination with raised lipolysis and FA reesterification leads to increased adipocyte energy expenditure via TAG/FA cycle stimulation (futile cycle). Therefore, palmitoleic acid plays a relevant role in WAT metabolism and should be considered as a candidate to be tested in obesity-related therapies.

Methods

Cell culture

3 T3-L1 preadipocytes were cultured in Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) containing 10% calf serum and 1% penicillin-streptomycin until confluence. Differentiation was induced 2 days post-confluence by addition of dexamethasone (1 μ M), isobutylmethylxanthine (0.5 mM), insulin (1.67 μ M), and 10% fetal bovine serum (FBS). After

48 h, medium was replaced by DMEM containing 10% FBS and 0.41 μ M insulin [20]. Cells were cultivated for 9 days in the presence of palmitic acid (16:0), palmitoleic acid (16:1n7), each at 100 μ M dissolved in ethanol 0.05% (vehicle), starting from the first day of differentiation (day 0). This dose of palmitoleic acid was found to have no cytotoxic or deleterious effects on cells as evaluated by plasma membrane integrity and DNA fragmentation during differentiation until the day 9 [21]. As we demonstrated before [18] that the palmitoleic acid effects in adipocytes are structure specific, here, we did not add more additional control such as oleic acid (18:1n9) to the cell cultures. In some experiments, etomoxir (Sigma-Aldrich), an inhibitor of CPT-1 activity, was used to inhibit fatty acid oxidation at a concentration of 40 μ M, added 24 h before the experiments. Cell culture medium was changed every 2 days. All reagents and drugs were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Similar procedure was used in our previous studies [18].

Lipolysis measurement

Lipolysis was estimated as the rate of glycerol (Free Glycerol Determination Kit, Sigma) and free fatty acid (FFA) (NEFA Kit RH series, Wako Diagnostics, CA, USA) released from differentiated 3 T3-L1 cells after 9-day treatment with the fatty acids or vehicle (in some experiments with or without etomoxir) during 30 min of incubation. Similar procedure was used in our previous studies [18, 22]. Results were expressed as nanomoles of glycerol per 10⁶ cells and μ Eq/L of free FA per well for glycerol and FFA, respectively.

Incorporation of [1-¹⁴C]-palmitate into triacylglycerol

KRH (Krebs Ringer Hepes bicarbonate) buffer, pH 7.4, containing 1% BSA and 2 mM glucose plus palmitate (200 μ M), saturated with a gas mixture of 95% O₂ and 5% CO₂ was added to 3 T3-L1 cells after 9-day treatment with FA or vehicle. [1-¹⁴C]-Palmitate was then added to the buffer (1850 Bq/tube or well) and left for 2 h at 37 °C. Cells were then washed three times with phosphate buffered saline (PBS) and Dole's reagent containing isopropanol:n-heptane:H₂SO₄ (4:1:0.25 vol/vol/vol) was added to the remaining reaction mixture for lipid extraction.

The mixture was transferred to polypropylene tubes, which were vortexed three times during the following 30 min. After adding n-heptane (1.5 mL) and distilled water (1.5 mL), tubes were vortexed and the mixture was decanted for additional 5 min. The upper phase was collected (in duplicates) and transferred to a scintillation vial for determination of radioactivity trapped into TAG using a β -counter (1450 LSC, Counter MicroBeta, Trilux; PerkinElmer). Results were expressed as nanomoles of FA

per 10^6 cells. Similar procedure has been used in our previous studies [18].

Decarboxylation of [1- 14 C]-palmitate (fatty acid oxidation)

Differentiated 3 T3-L1 cells (after 9-day treatment with FA or vehicle) were incubated in KRH buffer (pH 7.4) containing BSA (1%) and [1- 14 C]-palmitate (50 μ M, 1850 Bq/tube or well), saturated with a gas mixture of 95% O_2 and 5% CO_2 , for 2 h, at 37 °C. Prior to 2 h incubation period, each well was covered with a piece of Whatman filter paper and the plate was sealed with parafilm to maintain the atmosphere saturated with the gas mixture. Following the 2 h incubation, the filter paper was soaked with 0.1 mL of ethanolamine to trap the CO_2 produced, and 0.2 mL of 8 N H_2SO_4 was injected into the wells with the aid of a needle to rupture the cells. After 45 min of CO_2 trapping, the filter paper was removed and transferred to scintillation vials for radioactivity counting [23, 24]. Results were expressed as nanomoles of oxidized [1- 14 C]-palmitate per 10^6 cells.

Oxygen consumption

Oxygen consumption rates in intact cells were measured as an indication of mitochondrial respiratory activity. After 9-day treatment with palmitic acid (100 μ M), palmitoleic acid (100 μ M) or vehicle, 3 T3-L1 cells were gently trypsinised, re-suspended in KRH (pH 7.4) containing BSA (0.1%), and transferred to the oxygraph (OROBOROS Oxygraph-2 k). The oxygraph chambers were previously equilibrated with KRH containing BSA 0.1% at 37 °C. Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP, 1 μ M f.c.) was added as positive control for maximal respiratory rate (uncoupling) determination. Oxygen consumption rates were normalized by cell number and expressed as % of the control [25]. Oxygen consumption was also measured in mature 3 T3-L1 adipocytes (9 days after differentiation) treated for 24 h with palmitoleic acid (200 μ M) or vehicle.

ATP content determination

ATP content was determined in 3 T3-L1 cell lysates after 9 days of treatment with FA or vehicle (in the presence or absence of etomoxir) using an ATP bioluminescence assay kit (Roche, Mannheim, Germany). Measurements were performed in a luminometer (Biotech, model: Synergy HT). Results were normalized by cell number and expressed as percentage of control [26].

Western blot analysis

After treatment with FA or vehicle for 9 days, 3 T3-L1 cells were homogenized and processed in buffer composed in mM by: 50 HEPES, 40 NaCl, 50 NaF, 2 EDTA, 10 sodium pyrophosphate, 10 sodium glycerophosphate, 2 sodium orthovanadate, and 1% Triton-X100 and EDTA-free

protease inhibitors. Identical amounts of protein aliquots from 3 T3-L1 cell lysates were resolved on NuPAGE gradient gels (4–12%, Invitrogen Life Technologies) and transferred to nitrocellulose membranes. After blockage with 5% milk for 1 h, membranes were overnight incubated at 4 °C with the following primary antibodies: mitochondrial complex I subunit NDUF8 (20 kDa), complex II subunit 30 kDa (30 kDa), complex III subunit Core 2 (48 kDa), COXIV subunit I (40 kDa), complex V ATP synthase subunit alpha (53 kDa) (OXPHOS kit, MitoSciences, Inc.) and gamma-tubulin (~ 50 kDa #5886, Cell Signaling, Beverly, MA, USA) in 5% milk (1:1000). After washing, membranes were subsequently incubated with appropriate peroxidase-conjugated secondary antibody (1:5000) for 1 h and developed using the ECL enhanced chemiluminescence substrate (GE Healthcare Life Sciences, Björksgatan, Uppsala). Densitometric analyses were performed using the ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

RNA extraction, reverse transcription and quantitative real-time PCR (real-time qRT-PCR)

Total RNA from 3 T3-L1 cell lysates was extracted using Trizol (Invitrogen Life Technologies), analyzed for quality on agarose gel and absorbance ratios of 260/280 nm and 260/230 nm, and reverse transcribed to cDNA using the SuperScript III cDNA kit (Invitrogen Life Technologies). Gene expression was evaluated by real-time qRT-PCR using a Rotor Gene (Qiagen, Roermond, Netherlands) and SYBR Green as fluorescent dye (Qiagen) with 36B4/Rplp0 as housekeeping gene. The reaction conditions were as follows: 95 °C for 5 min, then 40 cycles of 95 °C for 5 s and 60 °C for 10 s. PCR products were run on agarose gel to confirm the size of the fragment and specificity of amplification. Primers used were: *Pnpla2* (5'-3' sense: GGTCCTCTGCATCCCTCCTT; 5'-3'antisense: CTGTC CTGAGGGAGATGTC), *aP2* (5'-3' sense: AAGGTGAA G AGCATCATAACCCT; 5'-3'antisense: TCACGCCTTT CATAACACATTCC) and *36B4* (5'-3' sense: TAAAGA CTGGAGACAAGGTG; 5'-3'antisense: GTGTACTCAG TCTCCAC AGA). Data were obtained as ct values (ct = cycle number at which logarithmic PCR plots cross a calculated threshold line) and used to determine Δ ct values (Δ ct = (ct of the target gene) - (ct of the housekeeping gene)). Data were expressed as arbitrary units using the following calculation: [expression = $1000 \times (2^{-\Delta ct})$ arbitrary units (AU)].

Mitochondrial mass determination

The methodology was based on the protocol used by Shen et al. [25]. A fluorescent probe (Mito-Tracker Green FM; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) was used to determine the mitochondrial mass of adipocytes [27]. Mature adipocytes (9 days of differentiation) were

treated with palmitic or palmitoleic acid, trypsinised and centrifuged at $1500\times g$, $4^{\circ}C$, for 5 min, resuspended in KRH buffer containing 0.1% BSA (*w/v*) and then incubated with $0.1\ \mu\text{mol/L}$ MitoTracker Green FM in KRH buffer for 30 min at $37^{\circ}C$. Cells were centrifuged at $1500\times g$, $4^{\circ}C$, for 5 min and resuspended in $400\ \mu\text{L}$ of fresh KRH buffer. Fluorescence measurements were carried out in CALIBUR cytometer (BD) in the FL1 channel. Ten thousand events were analyzed per experiment. Data were analyzed using Cell Quest software.

Citrate synthase activity assay

Citrate synthase (EC 4.1.3.7) maximum activity was determined as previously described by Alp et al. [28]. Briefly, after 9 days treatment with FA or vehicle, 3 T3-L1 cells were homogenized (vortex) in extraction buffer containing Tris-HCl (50 mM), EDTA (1 mM), leupeptin (50 μM), and aprotinin (5 μM), pH 7.4, and centrifuged ($16,000\ g$, 30 s, $4^{\circ}C$). The assay buffer consisted of Tris HCl (100 mM), DTNB (0.2 mM), acetyl-CoA (100 mM), and Triton (1%), pH 6.5. The reaction was started by adding 10 μL of oxaloacetic acid (500 mM) $25^{\circ}C$. The absorbance was monitored for 10 min at 420 nm. Protein concentration in the supernatants was determined using a BCA[®] protein assay kit (PIERCE Biotechnology, Rockford, IL). The maximal enzyme activity was expressed as micromoles per minute per microgram of protein.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SEM. One-Way ANOVA followed by Tukey post-hoc test were used to compare the effects of different treatments. Analysis was performed using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). The level of significance was set at $p \leq 0.05$.

Results

First, we examined the effect of 9-day treatment with palmitoleic or palmitic acid on 3 T3-L1 adipocyte lipolysis. Palmitoleic acid increased both basal (by 3-fold) and stimulated (by 3.5-fold) lipolysis as measured by the glycerol released to the medium [mean \pm SEM, Basal (vehicle: 828.9 ± 95.4 ; 16:1n7: 3027.2 ± 511) and stimulated (vehicle: 1760.3 ± 174 ; 16:1n7: 6077.7 ± 822) nMol/ 10^6 cells, $p < 0.05$] (Fig. 1a and b, respectively). *Pnpla2* mRNA levels were significantly increased (by 30%) in cells treated with palmitoleic acid (Fig. 1c). We further investigated whether 16:1n7 would also promote an increase in free fatty acid (FFA) release by these cells (dictated by a glycerol/FA proportion of 1:3, as products of TAG hydrolysis). Palmitoleic acid did not cause significant increase of FFA release into the medium, that is, no difference was observed among the groups. Interestingly, this profile was slightly altered by pretreatment with etomoxir (a potent inhibitor of fatty acid mitochondrial uptake and oxidation), since 16:1n7 + etomoxir treated cells presented an increase by 5% in the FFA release into the medium (mean \pm SEM, 16:1n7: 59.2 ± 0.8 ; 16:1n7 + etomoxir: $63.3 \pm 0.44\ \mu\text{Mol/L}$, $p < 0.05$) (Fig. 3b). We did not observe any effect of palmitic acid on lipolytic activity.

We hypothesized that palmitoleic acid should boost TAG lipolysis/FA re-esterification cycle. To test this hypothesis, we analyzed if FA esterification was raised in cells treated with palmitoleic acid. Indeed, an increase of [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-palmitate incorporation into TAG (by 40%) was observed in cells treated with palmitoleic acid (mean \pm SEM, vehicle: 23.42 ± 0.5 ; 16:1n7: 28.73 ± 0.8 nMol/ 10^6 cells, $p < 0.05$) (Fig. 2a). Moreover, *aP2* mRNA levels were positively regulated by palmitoleic acid (Fig. 2b). These results show that FA incorporation into TAG is increased in 3 T3-L1 adipocytes treated with palmitoleic acid. No effect on the synthesis of TAG was observed in cells treated with palmitic acid.

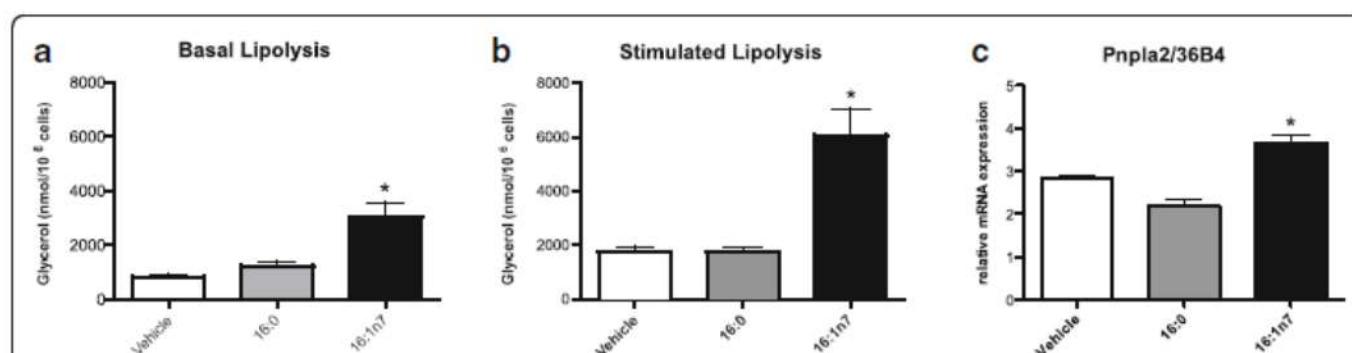


Fig. 1 Basal (a) and isoproterenol-stimulated (b) lipolysis measuring by release of glycerol (nanomoles per 10^6 cells). c mRNA levels of *Pnpla2* gene (arbitrary units). Experiments performed in differentiated 3 T3-L1 adipocytes treated for 9 days with vehicle, palmitic acid (16:0, 100 μM) or palmitoleic acid (16:1n7, 100 μM). Results are means \pm SEM. * $P < 0.05$ 16:1n7 vs. all groups. The results are the average of 3 independent experiments ($n = 4/\text{experiment}$)

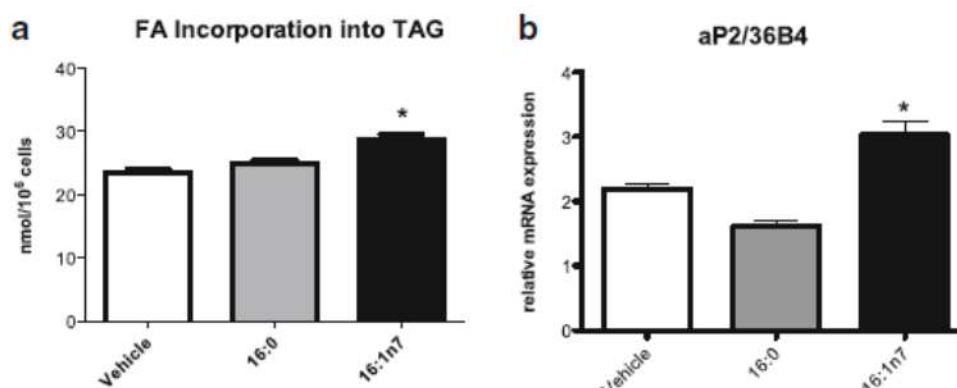


Fig. 2 **a** [1-¹⁴C]-palmitate incorporation into TAG (nanomoles of incorporated [1-¹⁴C]-palmitate per 10⁶ cells) and **b** mRNA levels of *aP2* (arbitrary units). Experiments performed in differentiated 3 T3-L1 adipocytes treated for 9 days with vehicle, palmitic acid (16:0, 100 μ M) or palmitoleic acid (16:1n7, 100 μ M). Results are means \pm SEM. * $P < 0.05$ 16:1n7 vs. all groups. The results are the average of 3 independent experiments ($n = 6$ /experiment)

Next, we investigated if palmitoleic acid could enhance FA beta-oxidation. The conversion of [1-¹⁴C]-palmitate to CO₂ was raised by 30% in cells treated with palmitoleic acid when compared to control cells (mean \pm SEM, vehicle: 0.8 ± 0.033 ; 16:1n7: 1.03 ± 0.05 nMol/10⁶ cells, $p < 0.05$) (Fig. 3a). No change in FAO was observed in cells treated with palmitic acid when compared to control. Disruption of fatty acid oxidation by etomoxir in a dose of 40 μ M was confirmed in this experiment by partial attenuation (~25%) of fatty acid oxidation.

Other mitochondrial parameters, such as ATP levels and oxygen consumption, were also measured in 3 T3-L1 cells. FA oxidation is a metabolic pathway that requires oxygen to take place. We performed oxygen consumption measurements in 3 T3-L1 adipocytes treated with fatty acids using a modular system for high-resolution respirometry (HRR), the Oroboros Oxygraph-2 k (O2k).

Oxygen consumption was raised in cells treated with palmitoleic acid for 9 days (by 13%, Fig. 4a) and 24 h (by 10%, Fig. 4b). So, palmitoleic acid stimulates basal energetic metabolism in white adipocytes. Palmitic acid treatment did not affect oxygen consumption in any of the conditions studied.

We further investigated the palmitoleic effects on ATP content. 16:1n7, but not 16:0 treatment of the cells, raised ATP levels by 17% (mean \pm SEM, vehicle: 100 ± 1.72 ; 16:1n7: 119.8 ± 1.51 percentage of control, $p < 0.05$) (Fig. 5). We hypothesized that raised FAO, secondary to raised lipolysis promoted by 16:1n7, elevates ATP production (corroborating oxygen consumption) in a magnitude capable of overcome its consumption (raised by the exacerbation of TAG/FA cycle). This hypothesis is supported here, by the experiments performed under pretreatment of the cells with etomoxir, that completely prevented the increment on ATP content induced by palmitoleic acid (Fig. 5).

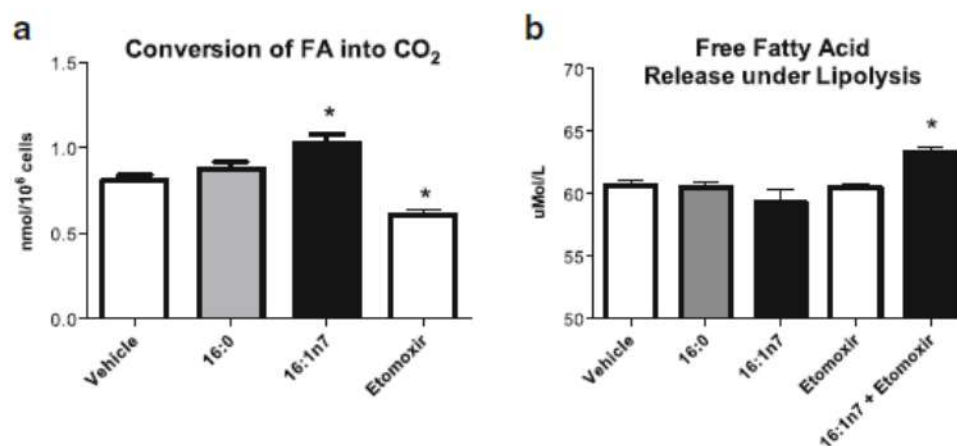


Fig. 3 **a** Conversion of [1-¹⁴C]-palmitate into CO₂ (nanomoles of converted [1-¹⁴C]-palmitate into CO₂ per 10⁶ cells) and **b** Free fatty acids released under lipolysis (μ Mol per liter per well). Experiments performed in 3 T3-L1 adipocytes under 9-days treatment with vehicle, etomoxir (40 μ M), palmitic acid (16:0, 100 μ M) or palmitoleic acid (16:1n7, 100 μ M). Results are means \pm SEM. * $P < 0.05$ vs. all groups. The results are the average of 3 independent experiments ($n = 4$ /experiment)

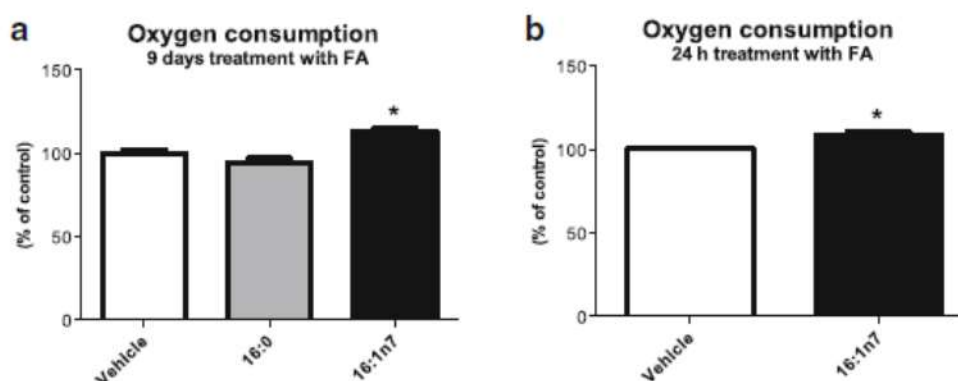


Fig. 4 Oxygen consumption by 3 T3-L1 adipocytes under (a) chronic (9 days) and (b) acute (24 h) treatments with vehicle, palmitic acid (16:0, 100 μ M, respectively) or palmitoleic acid (16:1n7, 200 or 100 μ M, respectively). Results expressed as percentage of control. Results are presented as means \pm SEM. * $P < 0.05$ 16:1n7 vs. all groups. The results are the average of 3 independent experiments ($n = 6$ /experiment)

Since the augmented ATP concentration observed in our studies suggest an increment in mitochondrial OXPHOS efficiency, we next evaluated protein expression of subunits representing complex II, III, and V of the mitochondrial electron transport chain. Complex II and III were positively modulated by palmitoleic acid (by 54% and by 36%, respectively), but not by palmitic acid, when compared with the control group (Fig. 6b and c). Likewise, complex V was positively modulated by palmitoleic acid (by 40%) when compared to the control group (Fig. 7e). However, palmitoleic acid did not elicit any change in the content of mitochondrial complexes I and IV (Fig. 6a and d, respectively).

Mitochondria mass was evaluated by flow cytometry, according to the methodology proposed by Shen and colleagues [25]. A decrease of $\sim 10\%$ in mitochondria mass was observed in cells treated with palmitoleic acid. There was no effect of palmitic acid on this parameter (Fig. 7a). Another parameter to measure mitochondria content is citrate synthase activity. Palmitoleic acid (but not palmitic acid) led also to a reduction of $\sim 10\%$ in citrate synthase activity (mean \pm SEM, vehicle: 0.031 ± 0.0005 ; 16:1n7: 0.024 ± 0.0008 μ Mol/min/ μ g of protein, $p < 0.05$) (Fig. 7b), when compared with the control group.

Discussion

3 T3-L1 adipocytes were treated with palmitic acid or palmitoleic acid, being the latter recently described to induce important effects on carbohydrate and lipid metabolism in liver and skeletal muscle [12, 15, 29, 30]. We have previously demonstrated that palmitoleic acid controls important metabolic processes also in adipose tissue. We reported increased lipolysis and glucose uptake, together with changes in expression of related genes and proteins (ATGL, HSL, AMPK and GLUT4) in white adipocytes [18, 19]. In the present work, we observed that palmitoleic acid modulates other aspects of adipocyte metabolism, mainly mitochondria bioenergetics. Palmitoleic acid (but not palmitic acid) enhanced energy expenditure in adipocytes through TAG/FA cycle stimulation, FA oxidation, oxygen consumption and increased protein expression of subunits representing complex II, III, and V of the mitochondrial electron transport chain. The treatment of the adipocytes with palmitic acid (16:0), different from palmitoleic (16:1n7), showed no marked effect on the parameters herein studied.

An increase in both basal and isoproterenol-stimulated lipolysis, together with augmented gene expression of the *Pnpla2*, were observed in 3 T3-L1 cells treated with palmitoleic acid (9 days, from the induction of preadipocyte differentiation) when compared to the palmitic acid

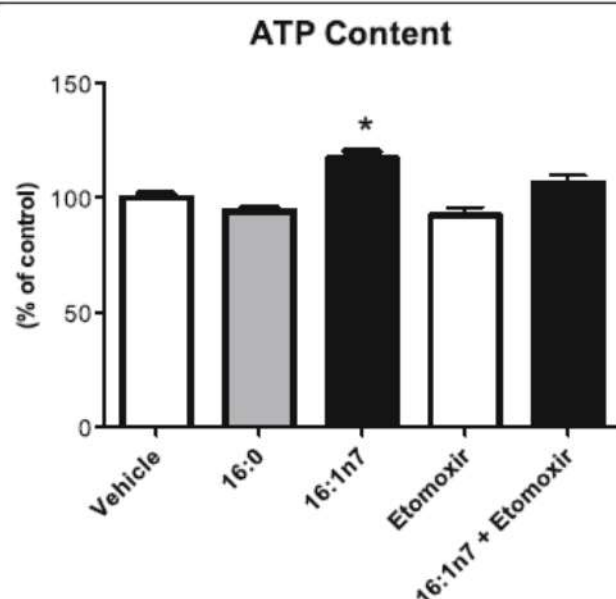


Fig. 5 ATP content on 3 T3-L1 adipocytes under 9-day treatment with vehicle, etomoxir (40 μ M), palmitic acid (16:0, 100 μ M) or palmitoleic acid (16:1n7, 100 μ M). Results expressed as percentage of control. Results are means \pm SEM. * $P < 0.05$ 16:1n7 vs. all groups. The results are the average of 3 independent experiments ($n = 4$ /experiment)

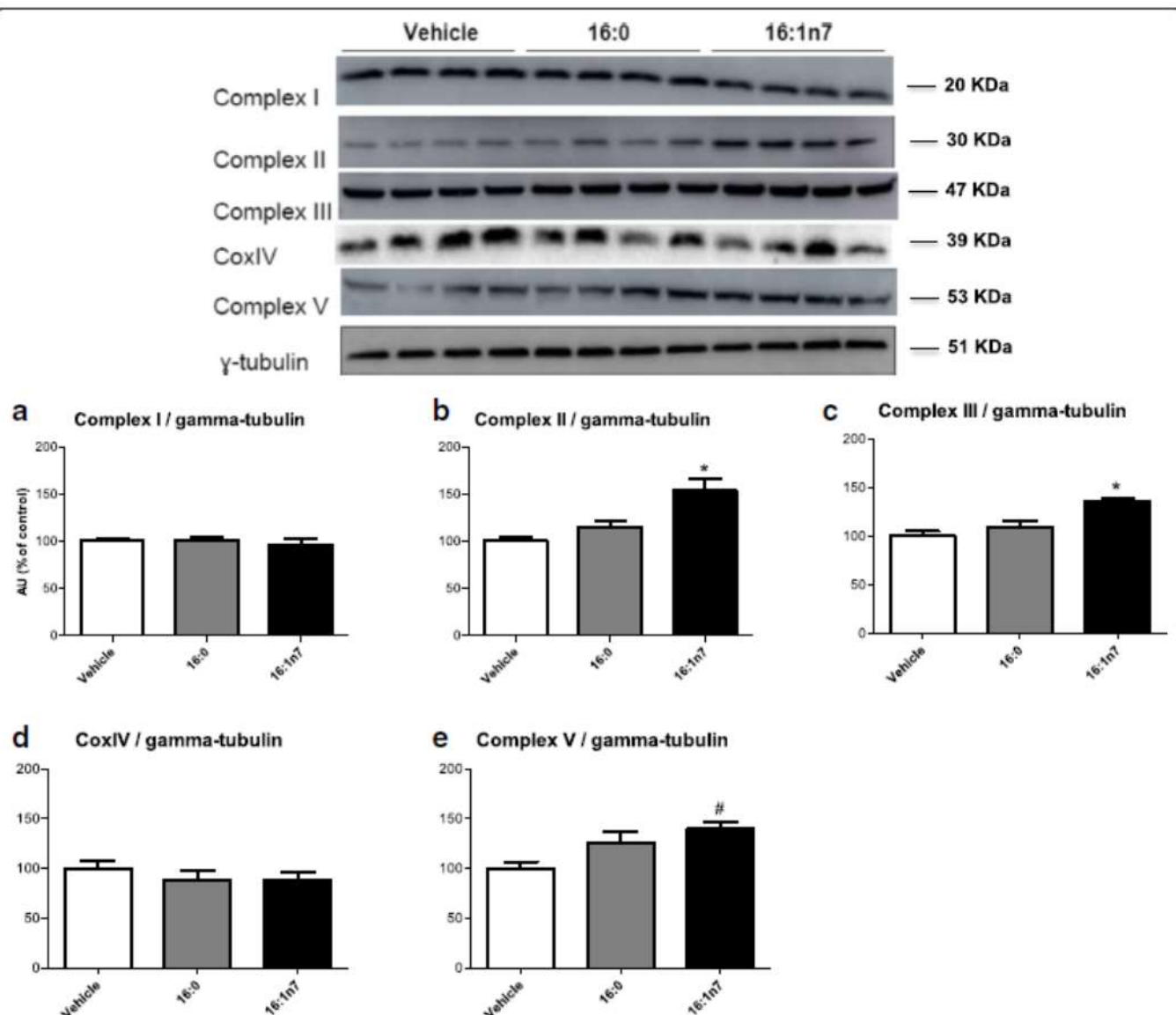


Fig. 6 Total content of subunits representing OXPHOS proteins complexes analyzed by western blot. **a** Complex I. **b** Complex II. **c** Complex III. **d** CoxIV. **e** Complex V. Experiments were performed in differentiated 3 T3-L1 adipocytes treated for 9 days with vehicle, palmitic acid (16:0, 100 μ M) or palmitoleic acid (16:1n7, 100 μ M). Results expressed as arbitrary units. Results are presented as means \pm SEM. * $P < 0.05$ 16:1n7 vs. all groups, # $P < 0.05$ 16:1n7 vs. vehicle. The results are the average of 3 independent experiments ($n = 4/\text{experiment}$)

and control groups. These findings corroborate previous ex vivo results obtained by our group [18]. We have shown that there is an increase of lipolysis in primary adipocytes extracted from epididymal fat pads of mice treated with palmitoleic acid (by gavage) for 10 days and also, in mature (6 days post-differentiation) 3 T3-L1 cells treated with palmitoleic acid (by 24 h), via a PPAR α -dependent mechanism. The increment in lipolysis promoted by palmitoleic acid was estimated according to the concentration of glycerol released into the medium. A concomitant increment of FFA released from adipocytes [dictated by a glycerol/FA proportion of 1:3, as products of TAG hydrolysis] treated with palmitoleic acid was not observed. This suggests that the fatty acids

originated from lipolysis of cells treated with palmitoleic acid could be used in other metabolic pathways such as: (1) re-esterification, (2) mitochondrial oxidation or (3) mitochondrial uncoupling, including the possibility of overlapping pathways. We ruled out mitochondrial uncoupling due to the fact that cellular ATP levels were augmented upon palmitoleic acid treatment (Fig. 5) and UCP1/2 mRNA levels are not altered under this condition (data not shown).

To test the hypothesis 1, we analyzed if FA esterification was increased in cells treated with palmitoleic acid for 9 days. Palmitoleic acid did increase [^{14}C]-palmitate incorporation into TAG as well as *aP2* mRNA levels in adipocytes. *aP2* gene encodes a protein involved in

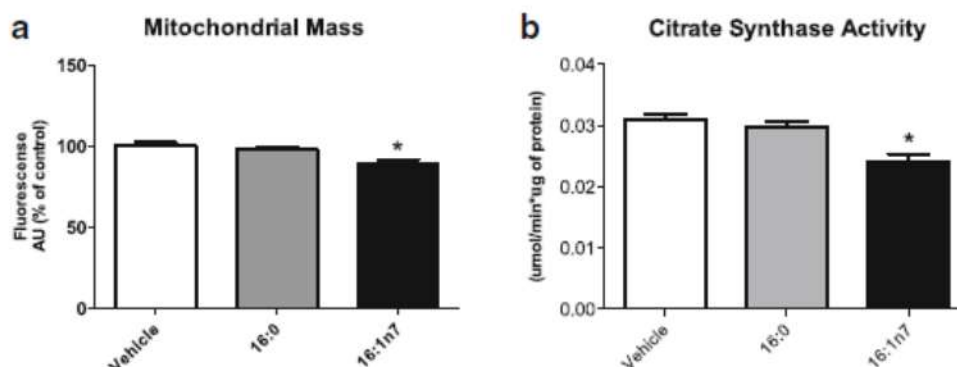


Fig. 7 **a** Mitochondrial mass (percentage of fluorescence). **b** Citrate synthase activity (micromoles per minute per microgram of protein). Experiments performed in differentiated 3 T3-L1 adipocytes treated for 9 days with vehicle, palmitic acid (16:0, 100 μ M) or palmitoleic acid (16:1n7, 100 μ M). Results are means \pm SEM. * $P < 0.05$ 16:1n7 vs. all groups. The results are the average of 3–4 independent experiments ($n = 6$ /experiment)

FA uptake and transport to be then associated to coenzyme A (a reaction catalyzed by acyl-CoA synthetase) to generate acyl-CoA. Corroborating these findings, we demonstrated an increase in the generation of glycerol 3-phosphate (G3-P) via glycolysis (required for esterification of fatty acids to TAG), as evidenced by the higher rates of glucose incorporation into the glycerol fraction of TAG [18]. In another recent work published by our group [19] an increase of glucose uptake by adipocytes, via a mechanism that involves AMPK, promoted by palmitoleic acid was demonstrated. This observation is compatible with increased G3-P formation from glucose, since there was not seen any increase in gene expression of the glyconeogenic regulatory enzyme PEPCK or in glycerol kinase activity in this study, the two other possible sources of G3-P [31]. These results suggest that palmitoleic acid promotes FA re-esterification and TAG/FA futile cycle stimulation.

A concomitant increase in lipolysis and FA re-esterification implies in stimulation of the substrate cycle (or “futile” cycle) TAG/FA cycle [32, 33]. In mammals, an increase in this cycle activity together with raised fatty acid oxidation can lead to augmented basal metabolic rate (BMR) and total energy expenditure [34] as well as greater sensitivity to hormonal control of energy metabolism (e.g. lipolytic and lipogenic activities). Additionally, the stimulation of this cycle is a mechanism associated with induction of thermogenesis during cold exposure [35] and also when plasma leptin levels are high [32].

In the next step, we investigated if palmitoleic acid could enhance FA beta-oxidation and oxygen consumption. Maassen, Romijn and Heine [36] suggested that FA oxidation in adipocytes might also contribute to the retention of FA in these cells, thus avoiding excessive release of FA into the circulation when lipolysis is stimulated reducing lipotoxicity. We observed an increase (by 30%) in FA oxidation in 3 T3-L1

adipocytes treated with palmitoleic acid. This effect maybe underestimated due to the fact that palmitoleic acid can compete with labeled [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-palmitate (50 μ M) added to the medium during this test for the beta-oxidation pathway.

Despite the fact that some studies describe FA oxidation as a minor metabolic pathway in white adipocytes, especially when compared to FA re-esterification [37–39], Dib, Bugge and Collins [40] claim that FA oxidation in WAT is not negligible and contributes from 5 to 10% of the BMR in lean and obese adults, respectively. Noteworthy, the percentage of endogenous FA oxidized in primary rat white adipocyte was calculated and found to be around 0.2%, what seems small when compared to re-esterified (~50%) and released endogenous FFA (~50,1%) [41]. We estimated herein the amount of FFA released by the cells, which were around 40 nmoles/ 10^6 cells. The estimated FFA released is much lower than the amount of glycerol released (by 70-fold) but it is much higher than the amount of CO_2 generated (~1 nmol/ 10^6 cells). This finding corroborates the data that FFA re-esterification and endogenously released FFA are the major pathways when compared to FFA oxidation. Anyway, pretreatment with etomoxir, that has been shown to bind CPT-1 with high affinity, thereby preventing mitochondrial uptake of fatty acids [42], caused an increment in the FFA release into the medium by the cells treated with palmitoleic acid. The disruption of fatty acid oxidation by etomoxir was confirmed here, by the attenuation of fatty acid oxidation.

Wang and cols [41] claim that FFA oxidation assays are usually performed during a short period of time (a 2-h period or so) and, if extrapolated to years, this oxidative pathway could reduce more than 1 kg of fat mass per 50 kg of fat mass per year in humans depending on if there is combined fasting or not. Therefore, WAT FAO

might be not so negligible as previously thought to be. Actually, efficient mitochondrial WAT FAO may increase respiratory capacity, reduce adipocyte size, enhance lipolysis and reduce lipotoxicity [6, 38, 43]. A recent study with human twins showed that adiposity is correlated with downshifting of FAO and that, indeed, mitochondrial biogenesis, oxidative metabolic pathways and OXPHOS proteins in subcutaneous adipose tissue are downregulated in acquired obesity [44]. Altogether these studies corroborate the hypothesis that mitochondrial WAT FAO stimulation has relevant effects on body energy balance.

Together with increased FAO, an increment in basal O_2 consumption was observed in 3 T3-L1 cells treated with palmitoleic acid, which suggests an increase in BMR of these cells. This enhancement in oxygen consumption could be explained by an increase in FAO, mitochondrial uncoupling or both [45].

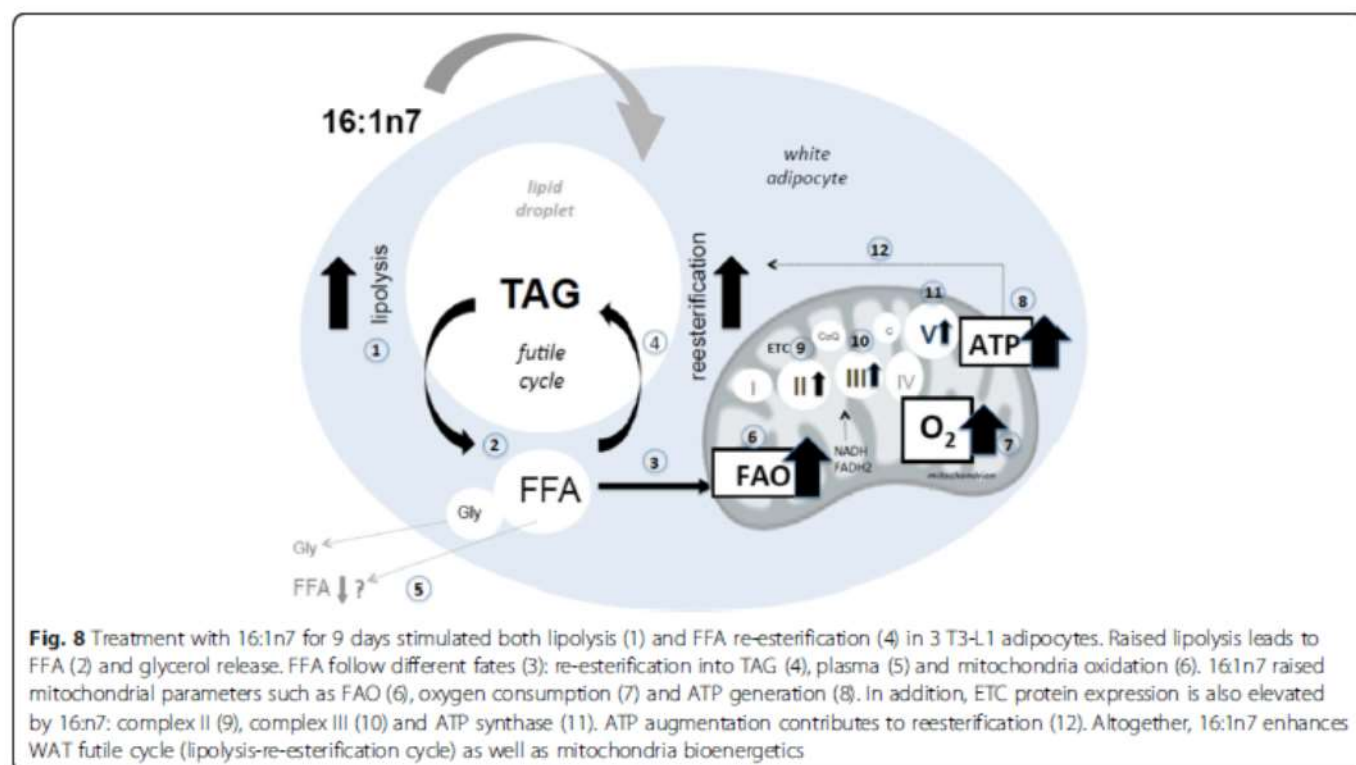
The augmentation in O_2 consumption observed in the present study supports the consistent raise in FAO catabolic pathway. In addition, cellular ATP levels were raised by 17% as well as protein levels of the subunit ATP-5A of the OXPHOS complex V (ATP synthase, Fig. 6e) upon palmitoleic acid treatment. Pretreatment with etomoxir completely prevented this effect, demonstrating the dependent effect of FAO increase for the palmitoleic effects here observed. Altogether, the raise in all these mitochondrial parameters: oxygen consumption, FAO and ATP generation, points out to enhanced mitochondrial oxidative phosphorylation efficiency [46] upon palmitoleic acid treatment. Although the palmitoleic acid effects seems mild, according Gao and colleagues [47] mitochondria do not require major changes to reflect a prominent metabolic effect. In contrast, abrupt mitochondrial changes are toxic and induce cell death. This work showed that both sudden increases or decreases cause mitochondrial damage by high levels of glucose and free fatty acids in 3 T3-L1 adipocytes.

At first, palmitoleic acid-induced increase in cellular ATP levels seems odd since raised AMP/ATP ratio is the main factor that leads to AMPK phosphorylation and activation. In addition, given the crucial role of the acyl-CoA synthetase in the re-esterification of FA released from lipolysis [48], this finding looks indeed unexpected. Acyl-CoA synthetase catalyzes the activation of 1 FA in 1 acyl-CoA, consuming 1 ATP (1 AMP and pyrophosphate). In fact, it utilizes two equivalents of ATP since pyrophosphate is cleaved into 2 inorganic phosphate molecules, breaking a high-energy phosphate bond. Nevertheless, FAO generates NADH and $FADH_2$, which enter the electron transport chain to produce ATP. Our hypothesis is that raised FAO (secondary to raised lipolysis) promoted by 16:1n7, elevates ATP production (corroborating oxygen consumption increase)

in a magnitude capable of overcome its consumption (raised by the exacerbation of TAG/FA cycle). This hypothesis is supported here, by the experiments performed under pretreatment of the cells with etomoxir, that completely prevented the increment on ATP content induced by palmitoleic acid. Actually, Baldwin et al. [49] calculated that the energy required for TAG/FA cycle is around 8 molecules of ATP per release and re-esterification of 3 molecules of FA (2,7 ATP/FA). This energetic demand could be provided by mitochondria FAO (fasting) and glucose oxidation (fed state) [50]. Indeed, the effectiveness of fuel oxidation by mitochondria relies on mitochondria content, mitochondrial activity and mitochondrial efficiency to synthesize ATP from the oxidation of substrates [46]. Noteworthy, relative to their dry mass, FA provide twice as much ATP as carbohydrates: six times more when comparing stored FA to stored glycogen [51]. It is importante to emphasize that cell lines in culture, including 3 T3-L1 cells, display a high rate of glycolysis. However, we can assume herein that glycolysis is not responsible for the increment in ATP levels, since the results showed that when CPT1 was inhibited in cells treated with palmitoleic acid, the ATP levels increase was completely abolished.

The augmented ATP concentration observed corroborates our data of an increment in mitochondrial OXPHOS efficiency (increased protein expression of subunits representing OXPHOS complex II, III and IV) in cells treated with 16:1n7. Raised ATP consumption is observed when lipolysis occurs simultaneously with FA re-esterification (TAG/FA cycle) [52]. As a paradox, augmented basal and isoproterenol stimulated lipolysis (promoted by 16:1n7) increases AMP/ATP ratio, which is known to promote AMPK activation [53], that, in turn, would stimulate catabolic pathways in order to increase ATP production, corroborating the data of raised beta-oxidation and oxygen consumption demonstrated herein. These findings also support the previous data shown by our group that 16:1n7 led to an increase on glucose uptake and oxidation associated with AMPK activation [19].

WAT mitochondria are potential targets in the search for the development of therapies to prevent and treat obesity, inflammation, insulin resistance and related disorders [6, 40, 54]. Ahmadian et al. (56) suggested that augmented lipolysis could result in a change in adipocyte metabolism via greater use of FA and enhanced energy expenditure, protecting against obesity [55]. The fact that palmitoleic acid reduced citrate synthase activity corroborates the results of decreased mitochondrial mass under the effect of this fatty acid, suggesting more efficient mitochondria, although fewer in number, in these adipocytes treated with palmitoleic acid. Indeed, relevant metabolic parameters of these cells were increased, such as oxygen



consumption, beta-oxidation, lipolysis and lipogenesis, which corroborates an increased intrinsic mitochondrial function as a physiologic adaptation. It is currently accepted that mitochondria are dynamic organelles, which adjust according to the cell's energy demand.

Mitochondrial function (particularly OXPHOS uncoupling and FA oxidation) is considered a crucial factor to improve systemic insulin sensitivity [56–59]. Mitochondrial oxidative capacity in WAT correlates negatively with adiposity [50]. For example, a WAT knockout mouse for Liver Receptor X alpha (ATaKO mouse) was generated and presented more weight gain and fat mass on a high-fat diet compared with wild-type controls as a result of the decrease in WAT lipolytic and oxidative capacities [60]. Accordingly, LXR activation in vivo and in vitro led to decreased WAT adipocyte size and increased glycerol release from primary adipocytes, respectively, with a concomitant increase in oxygen consumption [40]. Thereby, novel compounds with potential to stimulate lipolysis, TAG/FA cycle, FA oxidation in WAT are desired in therapies focusing obesity and related diseases.

Conclusions

In conclusion, our data show that palmitoleic acid plays an important role on WAT metabolic and mitochondrial function, suggesting an increase in energy expenditure of adipocytes by TAG/FA cycle acceleration, FA oxidation and oxygen consumption and, thus, raised cell energy metabolism. We presented

herein evidence indicating that palmitoleic acid, by concerted action on lipolysis, mitochondrial FA oxidation, ATP content and oxygen consumption, contributes to enhance white adipocyte energy expenditure and could be considered as a possible candidate for clinical research related to adipose tissue (Fig. 8). We believe that palmitoleic acid treatment alone or its combination with caloric restriction and/or exercise is a promise for future obesity treatment/prevention. Nevertheless, the mechanisms involved in palmitoleic-induced TAG/FA cycle stimulation via mitochondria function have to be fully elucidated.

Abbreviations

AMPK: AMP-activated protein kinase; aP2/FABP4: Fatty acid binding protein 4; ATGL/PNPLA2: Adipocyte triacylglycerol lipase; ATP: Adenosine 5'-triphosphate; BMR: Basal metabolic rate; CCCP: Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone; COXIV: Cytochrome c oxidase subunit IV; DMEM: Dulbecco's modified eagle medium; ETC: Electron transport chain; FA: Fatty acid; FADH₂: Flavin adenine dinucleotide; FAO: Fatty acid oxidation; FAS/FASN: Fatty acid synthase; FBS: Fetal bovine serum; FFA: Free fatty acid; G3-P: Glycerol 3-phosphate; G6PDH/H6PDH: Glucose 6 phosphate dehydrogenase; GLUT: Glucose transporter; HRR: High resolution respirometry; HSL/LIPE: Hormone sensitive lipase; KRH: Krebs ringer hepes bicarbonate buffer; LXRA: Liver X receptor alpha; NADH/NAD⁺: Nicotinamide adenine dinucleotide; OXPHOS: Oxidative phosphorylation; PBS: Phosphate buffered saline; PEPCK: Phosphoenolpyruvate carboxykinase; PKB or Akt: Protein kinase B; PPARα: Peroxisome proliferator-activated receptor alpha; TAG: Triacylglycerol; TAG/FA cycle: Triacylglycerol/fatty acid cycle; T2DM: Type 2 diabetes mellitus; UCP: Uncoupling protein; WAT: White adipose tissue

Acknowledgments

The authors acknowledge to Gilson Murata for technical assistance.

Funding

This work was supported by grants from FAPESP (2011/51627-8 and 2011/51701-3).

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

Authors' contributions

MMC, ABL, ARC, RCCS and WMTK performed the experiments, analyzed the results and revised the manuscript. RC and PBMA designed the study, analyzed the results and revised the manuscript. MICAV designed the study, analyzed the results, wrote the manuscript and supervised the study. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Department of Biological Sciences, Institute of Environmental Sciences, Chemical and Pharmaceutical, Federal University of São Paulo, 210, Sao Nicolau St, Diadema 09913-030, Brazil. ²Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. ³Interdisciplinary Postgraduate Program in Health Sciences, Institute of Physical Activity Sciences and Sports, Cruzeiro do Sul University, São Paulo, Brazil. ⁴Department of Nursing, Health Sciences Center, Federal University of Espírito Santo, Vitória, Brazil.

Received: 11 January 2018 Accepted: 13 March 2018

Published online: 20 March 2018

References

- Jensen MD. Lipolysis: contribution from regional fat. *Annu Rev Nutr.* 1997; 17:127–39. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.17.1.127>. PubMed PMID: 9240922.
- Ruge T, Hodson L, Cheeseman J, Dennis AL, Fielding BA, Humphreys SM, et al. Fasted to fed trafficking of fatty acids in human adipose tissue reveals a novel regulatory step for enhanced fat storage. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(5):1781–8. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-2090>. PubMed PMID: 19223522.
- Sethi JK, Vidal-Puig AJ. Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res.* 2007;48(6):1253–62. <https://doi.org/10.1194/jlr.R700005-JLR200>. PubMed PMID: 17374880; PubMed Central PMCID: PMC4303760.
- Lanza IR, Nair KS. Functional assessment of isolated mitochondria in vitro. *Methods Enzymol.* 2009;457:349–72. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)05020-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)05020-4). PubMed PMID: 19426878; PubMed Central PMCID: PMC2782617.
- Carriere A, Fernandez Y, Rigoulet M, Penicaud L, Castella L. Inhibition of preadipocyte proliferation by mitochondrial reactive oxygen species. *FEBS Lett.* 2003;550(1–3):163–7. PubMed PMID: 12935904.
- De Pauw A, Tejerina S, Raes M, Kelij J, Arnould T. Mitochondrial (dys) function in adipocyte (de)differentiation and systemic metabolic alterations. *Am J Pathol.* 2009;175(3):927–39. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.081155>. PubMed PMID: 19700756; PubMed Central PMCID: PMC2731113.
- Kita T, Nishida H, Shibata H, Nishi S, Higuti T, Arakaki N. Possible role of mitochondrial remodeling on cellular triacylglycerol accumulation. *J Biochem.* 2009;146(6):787–96. <https://doi.org/10.1093/jb/mvp124>. PubMed PMID: 19671539.
- Kaaman M, Sparks LM, van Harmelen V, Smith SR, Sjolin E, Dahlman I, et al. Strong association between mitochondrial DNA copy number and lipogenesis in human white adipose tissue. *Diabetologia.* 2007;50(12):2526–33. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0818-6>. PubMed PMID: 17879081.
- Sutherland LN, Bomhof MR, Capozzi LC, Basaraba SA, Wright DC. Exercise and adrenaline increase PGC-1[alpha] mRNA expression in rat adipose tissue. *J Physiol.* 2009;587(Pt 7):1607–17. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.165464>. PubMed PMID: 19221126; PubMed Central PMCID: PMC2678229.
- Duchen MR. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol Asp Med.* 2004;25(4):365–451. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2004.03.001>. PubMed PMID: 15302203.
- Geisler JG. Targeting energy expenditure via fuel switching and beyond. *Diabetologia.* 2011;54(2):237–44. <https://doi.org/10.1007/s00125-010-1932-4>. PubMed PMID: 20953861.
- Cao H, Gerhold K, Mayers JR, Wiest MM, Watkins SM, Hotamisligil GS. Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell.* 2008;134(6):933–44. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.048>. PubMed PMID: 18805087; PubMed Central PMCID: PMC2728618.
- Dimopoulos N, Watson M, Sakamoto K, Hundal HS. Differential effects of palmitate and palmitoleate on insulin action and glucose utilization in rat L6 skeletal muscle cells. *Biochem J.* 2006;399(3):473–81. <https://doi.org/10.1042/BJ20060244>. PubMed PMID: 16822230; PubMed Central PMCID: PMC1615906.
- Obanda DN, Cefalu WT. Modulation of cellular insulin signaling and PTP1B effects by lipid metabolites in skeletal muscle cells. *J Nutr Biochem.* 2013; 24(8):1529–37. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.12.014>. PubMed PMID: 23481236; PubMed Central PMCID: PMC4509740.
- Yang ZH, Miyahara H, Hatanaka A. Chronic administration of palmitoleic acid reduces insulin resistance and hepatic lipid accumulation in KK-Ay mice with genetic type 2 diabetes. *Lipids Health Dis.* 2011;10:20. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-20>. PubMed PMID: 21774832; PubMed Central PMCID: PMC3155149.
- Diakogiannaki E, Dhayal S, Childs CE, Calder PC, Walters HJ, Morgan NG. Mechanisms involved in the cytotoxic and cytoprotective actions of saturated versus monounsaturated long-chain fatty acids in pancreatic beta-cells. *J Endocrinol.* 2007;194(2):283–91. <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0082>. PubMed PMID: 17641278; PubMed Central PMCID: PMC1994570.
- Morgan NG, Dhayal S. Unsaturated fatty acids as cytoprotective agents in the pancreatic beta-cell. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2010;82(4–6): 231–6. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2010.02.018>. PubMed PMID: 20206490.
- Bolsoni-Lopes A, Festuccia WT, Farias TS, Chimin P, Torres-Leal FL, Derogis PB, et al. Palmitoleic acid (n-7) increases white adipocyte lipolysis and lipase content in a PPARalpha-dependent manner. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013;305(9):E1093–102. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00082.2013>. PubMed PMID: 24022867.
- Bolsoni-Lopes A, Festuccia WT, Chimin P, Farias TS, Torres-Leal FL, Cruz MM, et al. Palmitoleic acid (n-7) increases white adipocytes GLUT4 content and glucose uptake in association with AMPK activation. *Lipids Health Dis.* 2014; 13:199. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-13-199>. PubMed PMID: 25528561; PubMed Central PMCID: PMC4364637.
- Park BH, Qiang L, Farmer SR. Phosphorylation of C/EBPbeta at a consensus extracellular signal-regulated kinase/glycogen synthase kinase 3 site is required for the induction of adiponectin gene expression during the differentiation of mouse fibroblasts into adipocytes. *Mol Cell Biol.* 2004; 24(19):8671–80. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.19.8671-8680.2004>. PubMed PMID: 15367685; PubMed Central PMCID: PMC516726.
- Cruz MM. Efeitos dos ácidos graxos palmítico e palmítoleico sobre parâmetros metabólicos de adipócitos 3T3-L1 [Mestrado]: Universidade Federal de São Paulo; 2015.
- de Sa RD, Crisma AR, Cruz MM, Martins AR, Masi LN, do Amaral CL, et al. Fish oil prevents changes induced by a high-fat diet on metabolism and adipokine secretion in mice subcutaneous and visceral adipocytes. *J Physiol.* 2016;594(21):6301–17. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2016.01102>. PubMed PMID: 27558442; PubMed Central PMCID: PMC5088242.
- Amengual J, Petrov P, Bonet ML, Ribot J, Palou A. Induction of carnitine palmitoyl transferase 1 and fatty acid oxidation by retinoic acid in HepG2 cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44(11):2019–27. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.07.026>. PubMed PMID: 22871568.
- Mercader J, Madsen L, Felipe F, Palou A, Kristiansen K, Bonet ML. All-trans retinoic acid increases oxidative metabolism in mature adipocytes. *Cell Physiol Biochem.* 2007;20(6):1061–72. <https://doi.org/10.1159/000110717>. PubMed PMID: 17975308.

25. Shen W, Liu K, Tian C, Yang L, Li X, Ren J, et al. R-alpha-lipoic acid and acetyl-L-carnitine complementarily promote mitochondrial biogenesis in murine 3T3-L1 adipocytes. *Diabetologia*. 2008;51(1):165–74. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0852-4>. PubMed PMID: 18026715.
26. de Andrade PB, Rubi B, Frigerio F, van den Ouweland JM, Maassen JA, Maechler P. Diabetes-associated mitochondrial DNA mutation A3243G impairs cellular metabolic pathways necessary for beta cell function. *Diabetologia*. 2006;49(8):1816–26. <https://doi.org/10.1007/s00125-006-0301-9>. PubMed PMID: 16736129.
27. Tournaire F, Musinovic H, Gouranton E, Astier J, Marcotorchino J, Arreguin A, et al. All-trans retinoic acid induces oxidative phosphorylation and mitochondria biogenesis in adipocytes. *J Lipid Res*. 2015;56(6):1100–9. <https://doi.org/10.1194/jlr.M053652>. Epub 2015/04/29. PubMed PMID: 25914170; PubMed Central PMCID: PMC4442868.
28. Alp PR, Newsholme EA, Zammit VA. Activities of citrate synthase and NAD⁺-linked and NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. *Biochem J*. 1976;154(3):689–700.
29. Hodson L, Karpe F. Is there something special about palmitoleate? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2013;16(2):225–31. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32835d2edf>. PubMed PMID: 23324899.
30. Talbot NA, Wheeler-Jones CP, Cleasby ME. Palmitoleic acid prevents palmitic acid-induced macrophage activation and consequent p38 MAPK-mediated skeletal muscle insulin resistance. *Mol Cell Endocrinol*. 2014;393(1–2):129–42. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.06.010>. PubMed PMID: 24973767; PubMed Central PMCID: PMC4148479.
31. Forest C, Tordjman J, Glorian M, Dupuis E, Chauvet G, Quette J, et al. Fatty acid recycling in adipocytes: a role for glyceroneogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Biochem Soc Trans*. 2003;31(6):1125–9. Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/bst0311125>.
32. Reidy SP, Weber JM. Accelerated substrate cycling: a new energy-wasting role for leptin in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002;282(2):E312–7. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00037.2001>. PubMed PMID: 11788362.
33. Wolfe RR, Klein S, Carraro F, Weber JM. Role of triglyceride-fatty acid cycle in controlling fat metabolism in humans during and after exercise. *Am J Phys*. 1990;258(2 Pt 1):E382–9. PubMed PMID: 2106269.
34. Kaman LD, Boss O, Petroni OD, Kim JK, Martino JL, Zabolotny JM, et al. Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Mol Cell Biol*. 2000;20(15):5479–89. PubMed PMID: 10891488; PubMed Central PMCID: PMC85999.
35. Vallerand AL, Zamecnik J, Jones PJ, Jacobs L. Cold stress increases lipolysis, FFA Ra and TG/FFA cycling in humans. *Aviat Space Environ Med*. 1999;70(1):42–50. PubMed PMID: 9895020.
36. Maassen JA, Romijn JA, Heine RJ. Fatty acid-induced mitochondrial uncoupling in adipocytes as a key protective factor against insulin resistance and beta cell dysfunction: a new concept in the pathogenesis of obesity-associated type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2007;50(10):2036–41. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0776-z>. PubMed PMID: 17712547; PubMed Central PMCID: PMC2039833.
37. Baht HS, Saggerson ED. Comparison of triacylglycerol synthesis in rat brown and white adipocytes. Effects of hypothyroidism and streptozotocin-diabetes on enzyme activities and metabolic fluxes. *Biochem J*. 1988;250(2):325–33. PubMed PMID: 3355527; PubMed Central PMCID: PMC1148859.
38. Frayn KN, Langin D, Karpe F. Fatty acid-induced mitochondrial uncoupling in adipocytes is not a promising target for treatment of insulin resistance unless adipocyte oxidative capacity is increased. *Diabetologia*. 2008;51(3):394–7. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0901-z>. PubMed PMID: 18097647.
39. Harper RD, Saggerson ED. Factors affecting fatty acid oxidation in fat cells isolated from rat white adipose tissue. *J Lipid Res*. 1976;17(5):516–26. PubMed PMID: 965842.
40. Dib L, Bugge A, Collins S. LXRalpha fuels fatty acid-stimulated oxygen consumption in white adipocytes. *J Lipid Res*. 2014;55(2):247–57. <https://doi.org/10.1194/jlr.M043422>. PubMed PMID: 24259533; PubMed Central PMCID: PMC3886663.
41. Wang T, Zang Y, Ling W, Corkey BE, Guo W. Metabolic partitioning of endogenous fatty acid in adipocytes. *Obes Res*. 2003;11(7):880–7. <https://doi.org/10.1038/oby.2003.121>. PubMed PMID: 12855758.
42. den Hartigh LJ, Han CY, Wang S, Omer M, Chait A. 10E,12Z-conjugated linoleic acid impairs adipocyte triglyceride storage by enhancing fatty acid oxidation, lipolysis, and mitochondrial reactive oxygen species. *J Lipid Res*. 2013;54(11):2964–78. <https://doi.org/10.1194/jlr.M035188>. Epub 2013/08/21. PubMed PMID: 23956445; PubMed Central PMCID: PMC3793601.
43. Vankoningsloo S, Piens M, Lecocq C, Gilson A, De Pauw A, Renard P, et al. Mitochondrial dysfunction induces triglyceride accumulation in 3T3-L1 cells: role of fatty acid beta-oxidation and glucose. *J Lipid Res*. 2005;46(6):1133–49. <https://doi.org/10.1194/jlr.M400464>. JLR200. PubMed PMID: 15741651.
44. Heinonen S, Buzkova J, Muniandy M, Kaksonen R, Ollikainen M, Ismail K, et al. Impaired mitochondrial biogenesis in adipose tissue in acquired obesity. *Diabetes*. 2015;64(9):3135–45. <https://doi.org/10.2337/db14-1937>. PubMed PMID: 25972572.
45. Garlid KD, Jaburek M, Jezek P. Mechanism of uncoupling protein action. *Biochem Soc Trans*. 2001;29(Pt 6):803–6. PubMed PMID: 11709078.
46. Crescenzo R, Bianco F, Mazzoli A, Giacco A, Liverini G, Iossa S. Skeletal muscle mitochondrial energetic efficiency and aging. *Int J Mol Sci*. 2015;16(5):10674–85. <https://doi.org/10.3390/jms160510674>. PubMed PMID: 25970752; PubMed Central PMCID: PMC4463669.
47. Gao CL, Zhu C, Zhao YP, Chen XH, Ji CB, Zhang CM, et al. Mitochondrial dysfunction is induced by high levels of glucose and free fatty acids in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;320(1–2):25–33. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.01.039>. Epub 2010/02/11. PubMed PMID: 20144685.
48. Lobo S, Wiczler BM, Bernlohr DA. Functional analysis of long-chain acyl-CoA synthetase 1 in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*. 2009;284(27):18347–56. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.017244>. PubMed PMID: 19429676; PubMed Central PMCID: PMC2709349.
49. Baldwin RL. Metabolic functions affecting the contribution of adipose tissue to total energy expenditure. *Fed. Proc*. 1970;29:1277–83.
50. Flachs P, Rossmeisl M, Kuda O, Kopecky J. Stimulation of mitochondrial oxidative capacity in white fat independent of UCP1: a key to lean phenotype. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1831(5):986–1003. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.02.003>. PubMed PMID: 23454373.
51. Carracedo A, Cantley LC, Pandolfi PP. Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(4):227–32. <https://doi.org/10.1038/nrc3483>. PubMed PMID: 23446547; PubMed Central PMCID: PMC3766957.
52. Gauthier MS, Miyoshi H, Souza SC, Cacicado JM, Saha AK, Greenberg AS, et al. AMP-activated protein kinase is activated as a consequence of lipolysis in the adipocyte: potential mechanism and physiological relevance. *J Biol Chem*. 2008;283(24):16514–24. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708177200>. PubMed PMID: 18390901; PubMed Central PMCID: PMC2423258.
53. Liu Q, Gauthier MS, Sun L, Ruderman N, Lodish H. Activation of AMP-activated protein kinase signaling pathway by adiponectin and insulin in mouse adipocytes: requirement of acyl-CoA synthetases FATP1 and Acs1 and association with an elevation in AMP/ATP ratio. *FASEB J*. 2010;24(11):4229–39. <https://doi.org/10.1096/fj.10-159723>. PubMed PMID: 20667975; PubMed Central PMCID: PMC2974418.
54. Rogge MM. The role of impaired mitochondrial lipid oxidation in obesity. *Biol Res Nurs*. 2009;10(4):356–73. <https://doi.org/10.1177/1099800408329408>. PubMed PMID: 19190032.
55. Ahmadian M, Duncan RE, Sul HS. The skinny on fat: lipolysis and fatty acid utilization in adipocytes. *Trends Endocrinol Metab*. 2009;20(9):424–8. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.06.002>. PubMed PMID: 19796963; PubMed Central PMCID: PMC2764815.
56. Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med*. 2013;19(10):1252–63. <https://doi.org/10.1038/nm.3361>. PubMed PMID: 24100998.
57. Roman S, Agil A, Peran M, Alvaro-Galve E, Ruiz-Ojeda FJ, Fernandez-Vazquez G, et al. Brown adipose tissue and novel therapeutic approaches to treat metabolic disorders. *Transl Res*. 2015;165(4):464–79. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2014.11.002>. PubMed PMID: 25433289.
58. Rousset S, Alves-Guerra MC, Mozo J, Miouret B, Cassard-Doulcier AM, Bouillaud F, et al. The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes*. 2004;53(Suppl 1):S130–5. PubMed PMID: 14749278.
59. Surwit RS, Wang S, Petro AE, Sanchis D, Raimbault S, Ricquier D, et al. Diet-induced changes in uncoupling proteins in obesity-prone and obesity-resistant strains of mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(7):4061–5. PubMed PMID: 9520493; PubMed Central PMCID: PMC19963.
60. Bottcher H, Furst P. Decreased white fat cell thermogenesis in obese individuals. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1997;21(6):439–44. PubMed PMID: 9192226.

Apêndice C – Colaborações e trabalhos publicados durante o período do doutorado.

1- CAMARGO, LEANDRO DO NASCIMENTO ; RIGHETTI, RENATO FRAGA ; ARISTÓTELES, LUCIANA RITHA DE CÁSSIA ROLIM BARBOSA ; DOS SANTOS, TABATA MARUYAMA ; DE SOUZA, FLÁVIA CASTRO RIBAS ; FUKUZAKI, SILVIA ; CRUZ, MAYSA MARIANA ; ALONSO-VALE, MARIA ISABEL CARDOSO ; SARAIVA-ROMANHOLO, BEATRIZ MANGUEIRA ; PRADO, CARLA MÁXIMO ; MARTINS, MÍLTON DE ARRUDA ; LEICK, EDNA APARECIDA ; TIBÉRIO, IOLANDA DE FÁTIMA LOPES CALVO . Effects of Anti-IL-17 on Inflammation, Remodeling, and Oxidative Stress in an Experimental Model of Asthma Exacerbated by LPS. *Frontiers in Immunology*, v. 8, p. 1-14, 2018.

2- MONTEFERRANTE, GABRIELA APRIGIA ; CRUZ, MAYSA MARIANA ; MOGADOURO, GUILHERME ; FANTINI, VICTORIA DE OLIVEIRA ; CASTRO, PATRÍCIA OLIVEIRA ; HALPIN, PATRICIA ANNE ; LELLIS-SANTOS, CAMILO . Cardiac rhythm dance protocol: a smartphone-assisted, hands-on activity to introduce concepts of cardiovascular physiology and scientific methodology. *ADVANCES IN PHYSIOLOGY EDUCATION*, v. 42, p. 516-520, 2018.

3- SANTOS, TABATA M. DOS ; RIGHETTI, RENATO F. ; CAMARGO, LEANDRO DO N. ; SARAIVA-ROMANHOLO, BEATRIZ M. ; ARISTÓTELES, LUCIANA R. C. R. B. ; DE SOUZA, FLÁVIA C. R. ; FUKUZAKI, SILVIA ; ALONSO-VALE, MARIA I. C. ; CRUZ, MAYSA M. ; PRADO, CARLA M. ; LEICK, EDNA A. ; MARTINS, MILTON A. ; TIBÉRIO, IOLANDA F. L. C. . Effect of Anti-IL17 Antibody Treatment Alone and in Combination With Rho-Kinase Inhibitor in a Murine Model of Asthma. *Frontiers in Physiology*, v. 9, p. 1-19, 2018

4- RIGHETTI, RENATO FRAGA ; SANTOS, TABATA MARUYAMA DOS ; CAMARGO, LEANDRO DO NASCIMENTO ; ARISTÓTELES, LUCIANA RITHA CÁSSIA ROLIM BARBOSA ; FUKUZAKI, SILVIA ; SOUZA, FLÁVIA CASTRO RIBAS DE ; SANTANA, FERNANDA PAULA RONCON ; AGRELA, MARCUS VINICIUS RODRIGUES DE ; CRUZ, MAYSA MARIANA ; ALONSO-VALE, MARIA ISABEL CARDOSO ; GENARO, ISABELLA SANTOS ; SARAIVA-ROMANHOLO, BEATRIZ MANGUEIRA ; LEICK, EDNA APARECIDA ; MARTINS, MILTON DE ARRUDA ; PRADO, CARLA MÁXIMO ; TIBÉRIO, IOLANDA DE FÁTIMA LOPES CALVO . Protective Effects of Anti-IL17 on Acute Lung Injury Induced by LPS in Mice. *Frontiers in Pharmacology*, v. 9, p. 1-15, 2018

5- MASI, LAUREANE NUNES ; MARTINS, AMANDA ROQUE ; CRISMA, AMANDA RABELLO ; DO AMARAL, CÁTIA LIRA ; DAVANSO, MARIANA RODRIGUES ; SERDAN, TAMIRES DUARTE AFONSO ; DA CUNHA DE SÁ, ROBERTA DOURADO CAVALCANTE ; CRUZ, MAYSA MARIANA ; ALONSO-VALE, MARIA ISABEL

CARDOSO ; TORRES, ROSÂNGELA PAVAN ; MANCINI-FILHO, JORGE ; PEREIRA, JOICE NAIARA BERTAGLIA ; DA SILVA RIGHETTI, MARTA MARIA ; LIBERTI, EDSON APARECIDO ; HIRABARA, SANDRO MASSAO ; CURI, RUI . Combination of a high-fat diet with sweetened condensed milk exacerbates inflammation and insulin resistance induced by each separately in mice. Scientific Reports, v. 7, p. 1-10, 2017